

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Mariann Koel

**Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 mikrovesiikulite
proteoomiline analüüs ja nende sissevõtmine endomeetriumi
rakuliini RL95-2**

Magistritöö

Juhendajad
Dotsent Sulev Ingerpuu
Professor Andres Salumets

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Rakkude poolt väliskeskkonda sekreteeritud vesiikulid.....	7
1.1.1. Apoptootilised kehad.....	8
1.1.2. Eksosoomid.....	9
1.1.3. Mikrovesiikulid.....	11
1.1.3.1. Mikrovesiikulite tekkemehhanism.....	12
1.1.3.2. Mikrovesiikulite molekulaarne koostis.....	14
1.1.3.3. Mikrovesiikulite funktsioonid.....	15
1.2. Embrüo implantatsioon.....	17
1.2.1. Platsenta moodustumine.....	18
1.2.2. Trofoblasti ja endomeetriumi rakkude vaheline suhtlus.....	20
1.2.2.1. Trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite osa organismi ja loote vahelises suhtluses.....	20
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1. Töö eesmärgid.....	22
2.2. Materjalid ja metoodika.....	23
2.2.1. Kasutatud antikehad.....	23
2.2.1.1. <i>Western blot</i> analüüsil kasutatud antikehad.....	23
2.2.1.2. Läbivoolu tsütofluorimeetrias kasutatud antikehad.....	24
2.2.1.3. Immunofluorestsentsmikroskoopias kasutatud antikehad.....	24
2.2.2. Kasutatud rakuliinid.....	24
2.2.3. Mikrovesiikulite ja eksosoomide eraldamine.....	25
2.2.4. Vesiikulite keskmise diameetri mõõtmine.....	26
2.2.5. Rakkude, mikrovesiikulite ja eksosoomide lüüsimine.....	26
2.2.6. Valkude SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforees ja <i>Western blot</i> analüüs.....	26
2.2.7. Läbivoolu tsütofluorimeetriline analüüs.....	27
2.2.8. Mikrovesiikulite mass-spektromeetria.....	28
2.2.9. Trofoblasti rakuliinidest JAR ja JEG-3 pärit mikrovesiikulite sisenemine endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkudesse.....	29
2.2.9.1. Mikrovesiikulite märgistamine.....	29
2.2.9.2. Märgistatud mikrovesiikulite sissevõtmine retsipientrakku.....	29

2.3. Tulemused.....	31
2.3.1. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite suuruse mõõtmine.....	31
2.3.2. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite markervalgu otsimine.....	31
2.3.2.1. JAR ja JEG-3 rakuliinidest pärit mikrovesiikulite markervalgu leidmine.....	32
2.3.2.2. Eksosoomide markervalgu CD63 tuvastamine JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud ja 100 000×g juures sadestatud vesiikulites.....	34
2.3.2.3. Eksosoomide markervalgu ekspressiooni kontroll 10 000×g juures sadestatud vesiikulitel.....	35
2.3.3. Mikrovesiikulite mass-spektromeetria.....	36
2.3.4. Mass-spektromeetria abil tuvastatud mikrovesiikulite valkude analüüs.....	37
2.3.5. Trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkude poolt.....	38
2.3.5.1. Trofoblasti mikrovesiikulite endomeetriumi rakkudesse sissevõtmise hindamine läbivoolu tsütofluorimeetria abil.....	38
2.3.5.2. Trofoblasti rakkudest pärit märgistatud mikrovesiikulitega mõjutatud endomeetriumi rakkude immunofluorestsents mikroskoopia.....	39
2.4. Arutelu.....	41
2.4.1. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite eraldamine ja iseloomustamine.....	41
2.4.2. Mikrovesiikulite valkude tuvastamine ja nende valgulise koostise analüüs.....	43
2.4.3. Endomeetriumi rakkude ja trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite koostoime.....	45
KOKKUVÕTE.....	47
SUMMARY.....	49
TÄNUSÕNAD.....	51
KASUTATUD KIRJANDUS.....	52
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	62
LISAD.....	63

KASUTATUD LÜHENDID

BSA - veise seerumi albumiin (ingl. k. *bovine serum albumin*)

DBN1 - ingl. k. *drebrin*

DPP3 - ingl. k. *dipeptidyl-peptidase 3*

EDTA - etüleendiamiintetraädikhape (ingl. k. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EE - varajane endosoom (ingl. k. *early endosome*)

EGF - epidermaalne kasvufaktor (ingl. k. *epidermal growth factor*)

EMMPRIN - ekstratsellulaarse matriksi metalloproteinaasi indutseerija (ingl. k. *extracellular matrix metalloproteinase inducer*)

ESCRT - transpordil kasutatavad endosomaalsed sorteerimiskompleksid (ingl. k. *endosomal sorting complex required for transport*)

EX - eksosoom

FCS - veise loote seerum (ingl. k. *fetal calf serum*)

GO - geeni ontoloogia (ingl. k. *gene ontology*)

hCG - inimese koorioni gonadotropiin (ingl. k. *human chorionic gonadotropin*)

HLA-G - inimese leukotsüüdi antigeen G (ingl. k. *human leukocyte antigen G*)

ICAM-1 - rakkudevaheline adhesioonimolekul-1 (ingl. k. *intercellular adhesion molecule-1*)

IFN- γ - interferoon- γ

IL11 - interleukiin 11

IL-1 β - interleukiin 1 β

IL6 - interleukiin 6

IL-8 - interleukiin 8

ILV - luumenisisene vesiikul (ingl. k. *intraluminal vesicle*)

LIF - leukeemia inhibiitor faktor (ingl. k. *leukemia inhibitory factor*)

MAK - monoklonaalne antikeha

MMP - maatriks metalloproteinaas (ingl. k. *matrix metalloproteinase*)

MVK - multivesikulaarne keha

MV - mikrovesiikul

PAK - polükloonaalne antikeha

PBS - fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl. k. *phosphate buffered saline*)

PE - fosfatidüületanoolamiin

PMSF - fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (ingl. k. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PS - fosfatidüülseriin

PVDF - polüvinülideenfluoriid (ingl. k. *polyvinylidene fluoride*)

RL - rakulüsaat

STBM - süntsüütiotrofoblasti mikrovesiikul

TACSTD2 - ingl. k. *tumor-associated calcium signal transducer 2*

TNF- α - tuumor nekroosi faktor α (ingl. k. *tumor necrosis factor α*)

Tris - tris(hüdroksümetüül)aminometaan

TSG101 - ingl. k. *tumor susceptibility gene 101*

SISSEJUHATUS

Raseduse kulgemine on keerukas protsess, mida reguleeritakse mitmel tasandil ning mis nõuab nii emaorganismi kui ka loote rakkude ülimalt koordineeritud koostööd. Embrüo pesastumisel ehk implanteerumisel toimub emaorganismi ja loote rakkude vahel pidev informatsiooni vahetamine, mille tulemusena hakkavad trofektodermi rakud diferentseeruma ning tungivad endomeetriummisse, moodustades funktsioneeriva platsenta. Selle protsessi häirimine võib põhjustada tõsiseid raseduse komplikatsioone. On teada, et ligi kolmandik varajase raseduse katkemistest võivad olla põhjustatud just embrüo implantatsiooni probleemidest. Siiani on emaorganismi ja embrüo vahelise suhtlemise uurimisel põhiline tähelepanu suunatud sekreteeritud faktoritele (mitmesugused valgud, valgulised ja steroidhormoonid), mis otse või vereringe vahendusel reguleerivad blastotsüsti kinnitumist emaka limaskestale. Viimastel aastatel on huviorbiiti tõusnud rakkude poolt ümbritsevasse keskkonda sekreteeritud vesiikulid. Rakkudest eralduvad vesiikulid on erineva tekkemehhanismiga ning sellest sõltuvalt on nii neid ümbritseva membraani kui ka luumeni molekulaarne koostis erinev. Kaks põhilist vesiikulite klassi on mikrovesiikulid ja eksosoomid. Tänapäevaks on kogunenud piisav hulk andmeid näitamaks, et mõlemat tüüpi vesiikulid võivad bioaktiivseid molekule ühest rakust teise üle kanda. Seega ühe raku poolt sekreteeritud vesiikulid võivad otseselt mõjutada teises rakus kulgevaid füsioloogilisi protsesse. Tänapäevaks on näidatud, et endomeetriumi rakud sekreteerivad eksosoomide ja mikrovesiikuleid, mis võivad potentsiaalselt mõjutada trofoblasti rakkude geeniekspressiooni ja lõpptulemusena soodustada nii implantatsiooniprotsessi kulgu. Siiani puuduvad andmed, kas trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid võiksid mõjutada endomeetriumi rakkude füsioloogiat.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli analüüsida trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritavate mikrovesiikulite valgulist koosseisu ning püüda leida mikrovesiikulite tuvastamiseks sobiv markervalk. Töö käigus püüti ka välja selgitada, kas trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid võiksid siseneda endomeetriumi rakkudesse ning seeläbi mängida rolli informatsiooni edasikandjatena trofoblasti koelt endomeetriumi rakkudele.

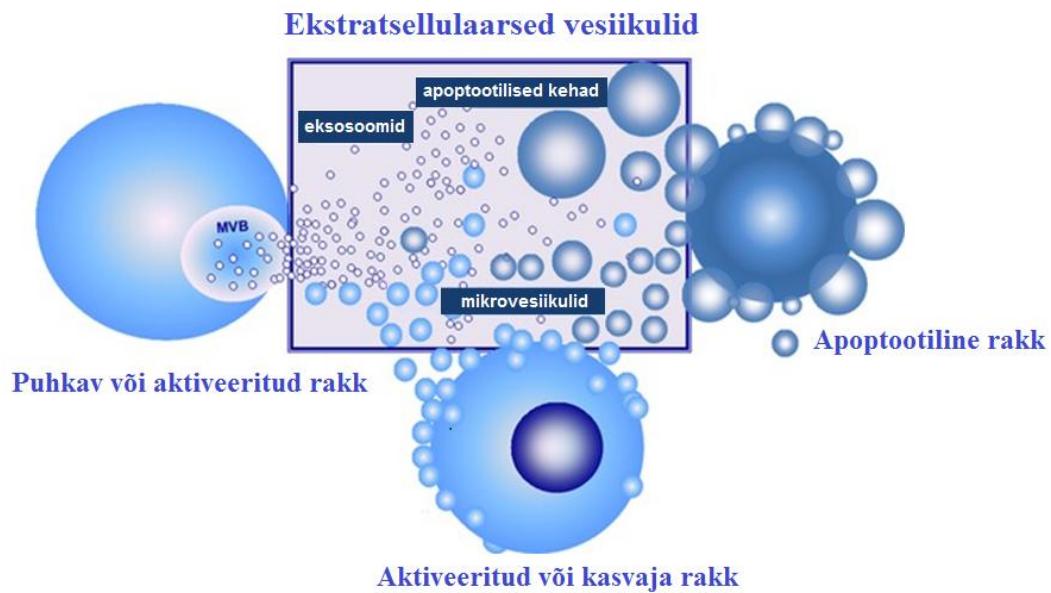
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Rakkude poolt väliskeskkonda sekreteeritud vesiikulid

Hulkaksete organismide rakuväline ruum sisaldab lahustunud ainevahetusprodukte, erinevaid ioone, valke ja polüsahhariide. Lisaks leidub seal ka suur hulk vabalt liikuvaid membraaniga ümbritsetud vesiikuleid. Need rakuvälised vesiikulid on sekreteeritud konstitutiivselt rakkude normaalse elutegevuse käigus või vastusena erinevatele stiimulitele. Esimene töö, kus on vihjeid rakuvälistele vesikulaarsetele struktuuridele, pärineb 1946. aastast, kui Chargaff ja West leidsid, et trombotsüütide vabast plasmast on võimalik sadestada trombiini teket mõjutavaid osakesi. Kaksikümmend üks aastat hiljem tõestas Peter Wolf elektronmikroskoopia abil, et need vereplasma vesiikulid pärinevad aktiveeritud trombotsüütidest ning nimetas need „trombotsüütide tolmuks“ (ingl. k *platelet dust*) (Wolf 1967). Praeguseks on leitud, et membraaniga ümbritsetud rakufragmente eraldavad enamus rakutüüpe ning neid on kirjeldatud praktiliselt kõigis kehavedelikes - näiteks vereplasmas (Caby jt., 2005; Wolf 1967), seerumis (Taylor jt., 2006; Wolf 1967), bronhioalveolaarvedelikus (Admyre jt., 2003), uriinis (Pisitkun jt., 2004; Smalley jt., 2008), kasvajate poolt toodetud astsiidis (Andre jt., 2002; Taylor jt., 1980), lootevees (Asea jt., 2008), rinnapiimas (Admyre jt., 2007) ja sünoviaalvedelikus (Skriner jt., 2006).

Esialgu peeti rakuväliseid vesiikuleid inertseks „rakuprügiks“, mis on tekkinud rakkude kahjustuste või plasmamembraani ümberpöördumise tulemusena (Siekevitz 1972). Juba mõned aastad hiljem avaldati esimene töö, kus leiti, et tsirkuleerivad plasmamembraani fragmendid on olulised membraanides paiknevate ensüümide transpordis (De Broe jt., 1977). Sellest alates lisandub üha enam uut informatsiooni rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite tähtsuse kohta rakkudevahelisel suhtlemisel. Hiljuti leiti, et lisaks membraansetele ja vesiikuli luumenis paiknevatele valgumolekulidele, sisaldavad vesiikulid ka mRNAsid (Baj-Krzyworzeka jt., 2006; J Ratajczak jt., 2006) ja mikroRNAsid (Valadi jt., 2007) suurendades veelgi nende olulisust rakkudevahelises informatsiooni ülekandes.

Rakuväliste vesiikulite populatsioon on heterogeenne. Vastavalt vesiikulite erinevale tekkemehhanismile, suurusele ja molekulaarsele koostisele eristatakse kolme sekreteeritavate vesiikulite põhitüüpi: apoptootilised kehad, mikrovesiikulid ja eksosoomid (Joonis 1). Sõltuvalt raku seisundist või stiimulite olemasolust keskkonnas võib üks rakk sekreteerida korraga mitmeid eri tüüpi vesiikuleid.



Joonis 1. Rakuvälised vesiikulid. Rakkude poolt väliskeskkonda sekreteeritud vesiikulite populatsioon koosneb põhiliselt kolme tüüpi vesiikulitest - apoptootilistest kehast, mikrovesiikulitest ja eksosoomidest. Joonise lihtsustamiseks ei ole näidatud, et sama rakk võib sekreteerida erinevaid vesiikuleid. Modifitseeritud (György jt., 2011) järgi.

1.1.1. Apoptootilised kehad

Koos mõistega apoptoos ehk kontrollitud rakusurm võttis J. F. R. Kerr 1972. aastal kasutusele ka termini apoptootiline keha. Ta kirjeldas sellega väikeseid, sfääri- või munakujulisi tsütoplasma fragmente, mis tekivad raku suremisel. Apoptootilise keha moodustumine algab raku tsütoplasma kondenseerumisest ja kariopüknoosist, millele järgneb tuuma fragmenteerumine (Kerr jt., 1972). Kaspasid poolt lõigatud ja aktiveerunud Rho kinaas ROCK-I suurendab rakkudes aktiini ja müosiini kompleksi kontsentratsiooni, mille tulemusena punguvad erineva suurusega, kompaktsed, membraaniga ümbritsetud raku jäänused (Cotter jt., 1992; Mills jt., 1998; Orlando jt., 2006). Enamuse apoptootiliste kehade diameeter jääb vahemikku 1-4 μm , mis on trombotsüütidega samas suurusjärgus, olles seega ülejäänud rakuvälistest vesiikulitest tunduvalt suuremad (Hristov jt., 2004). Mõned tööd on siiski näidanud, et osad apoptoosi tagajärjel tekkivad vesiikulid on ka väiksemad, olles võrreldavad isegi väikseimate sekreteeritavate vesiikulite - eksosoomidega (diameeter 40-100 nm) (Théry jt., 2001).

Kui jätta kõrvale apoptootiliste kehade mõõtmised ja erinev biogenees, siis ei ole neil omadusi, mis aitaks neid teistest rakuvälistest vesiikulitest eristada. Sarnaselt mikrovesiikulitele, mis

samuti punguvad plasmamembraanist, kannavad nad oma pinnal doonorrakust pärit valke. Põhiliseks apoptootiliste rakkude omaduseks on nende plasmamembraani fosfolipiidide asümmeetria kadumine, mille tulemusena raku pinnal paljastub anneksiin V-d siduv fosfatidüülseriini (Fadok jt., 1992). Sellest lähtuvalt peetakse tihti fosfatitüülseriini olemasolu apoptootilistele kehadele iseloomulikuks tunnuseks. Paraku esineb ka teiste rakuväliste vesiikulite moodustumisel samasugune plasmamembraani ümberkorraldumine ja fosfatitüülseriini ümberpaiknemine vesiikuli pinnale (Bettache jt., 1998), mistõttu ei saa apoptootilisi kehi eristada vaid nende membraanimarkerite kaudu. Viimasel ajal kasutatakse apoptootiliste kehade eristamiseks asjaolu, et võrreldes teiste rakuväliste vesiikulitega on nende lumen küllastatud fragmenteerunud DNA ja histoonidega (Berda-Haddad jt., 2011).

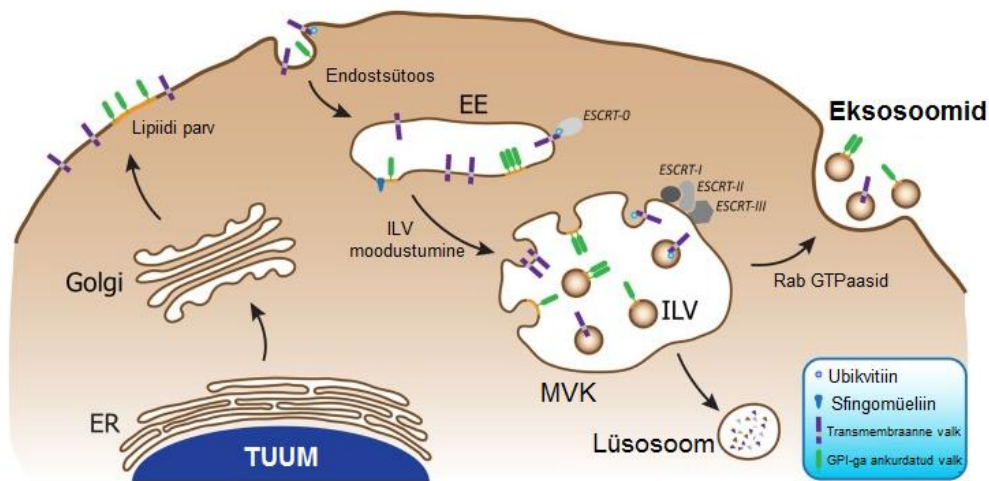
Apoptootiliste kehade teke on oluline tunnus, mis eristab apoptoosi suunduvat rakku nekrootilisest rakust. Sõltuvalt raku tüübist kondenseerub apoptootilise raku materjal üheks või mitmeks apoptootiliseks kehakeseks, vältides nii rakusiseste komponentide vabanemist rakuvälisesse ruumi ja hoides ära põletikulise vastuse (Orlando jt., 2006). Peale apoptootiliste kehade vabanemist on oluline tagada nende kiire ja efektiivne eemaldamine ümbritsevast keskkonnast. Juba 1972. aastal, näitas Kerr, et selleks mehhanismiks on apoptootiliste vesiikulite kiire fagotsüteerimine, mis arvatavasti on põhjustatud nende membraani omaduste muutumisest. 20 aastat hiljem näidatigi, et apoptootilise keha membraanile liikunud fosfatidüülseriini on makrofaagidele äratundmis- ja fagotsütoosi signaaliks (Fadok jt., 1992). Siiski ei põhine apoptootiliste kehade äratundmine ainult fosfatidüülseriini tuvastamisel, vaid ka erinevad pinnavalgud vahendavad vesiikulite ja makrofaagide seondumist. Näiteks makrofaagide vitronektiini retseptor ($\alpha V\beta 3$) (Savill jt., 1990) ja trombospondiini retseptor (CD36) (Ren jt., 1995) võivad osaleda apoptootilise vesiikuli äratundmises. Lisaks organismile ohtlike surevate rakkude tükkide eemaldamisele on apoptootilistel kehal ka muid funktsioone. Nad osalevad näiteks DNA (Holmgren jt., 1999), täpsemalt ka onkogeense toimega geenide (Bergsmedh jt., 2001) horisontaalses ülekandes, fagotsüteerivate rakkude poolt sissevõetuna T-rakkude epitoopide esitlemises (Bellone jt., 1997), autoantigeenide esitlemises B-rakkudele (Cocca jt., 2002) ning immunosupressiooni juhtimises (Voll jt., 1997).

1.1.2. Eksosoomid

Eksosoomid on rakuväliste vesiikulite hulgas kõige väiksemad. Juba 1983. aastal näidati, et retikulotsüüdid sekreteerivad neid 40-100 nm vesiikuleid (Harding jt., 1983). Siiski jäid

eksosoomid tõsisema tähelepanu alt välja kuni 1996. aastani, mil Raposo jt. näitasid nende rolli antigeenide esitlemises. Sellest hetkest alates kui avastati, et eksosoomidesse pakitakse mRNAsid ja miRNAsid (Valadi jt., 2007) on eksosoomide kohta käivate tööde hulk hüppeliselt suurenenud. Nüüdseks on eksosoomi kirjeldatud enamikes kehavedelikes ning seostatud praktiliselt kõigi rakutüüpidega.

Eksosoomi eristab teistest rakuvälistest vesiikulitest nende omapärane tekkemehhanism (Joonis 2). Eksosoomide moodustumine algab tsütoplasmas, kus endosoomide küpsemisel nende membraan sissesopistub ning selle käigus moodustuvad luumenisisesed vesiikulid. Selliseid vesiikuleid sisaldavaid hiliseid endosoomi nimetatakse multivesikulaarseteks kehadeks (MVK). Erinevalt klassikalisest endosomaalsest rajast, kus endosoomid ühinevad lüsoosoomidega ning nende sisaldis lagundatakse, ühinevad multivesikulaarsed kehad plasmamembraaniga ning luumenisisesed vesiikulid ehk eksosoomid vabanevad rakuvälisesse ruumi (Harding jt., 1983). Endosoomi membraani sissesopistumisel pakitakse moodustuvasse eksosoomi kindlad tsütosooli komponendid. On näidatud, et erinevatest rakkudest pärit eksosoomid sisaldavad samu molekule, mis on vajalikud nende vesiikulite biogeneesiks, struktuuri kujunemiseks ja transpordiks, aga ka rakutüübile iseloomulikke komponente, mis on vajalikud nende doonorrakkude bioloogiliste funktsioonide täitmiseks (Simpson jt., 2008). Ühed olulisemad valgud, mis tagavad MVK moodustumise ja valkude sortimise eksosoomidesse on ESCRT (ingl k. *endosomal sorting complexes required for transport*) kompleksi valgud. *In vitro* uuringud on näidanud, et ESCRT-0 kompleksi valgud tunnevad ära ja koguvad kokku raku tsütoplasmas ubikvitineeritud valgud, mis seejärel suunatakse ESCRT-I ja ESCRT-II komplekside abil tekkivasse MVK luumenisisesesse vesiikulisse. Lõpptulemusena lõikab ESCRT-III kompleks pungunud vesiikuli membraani küljest lahti, vabastades eksosoomi MVK sisemusse (Wollert ja Hurley 2010). Eksosoomide biogeneesi on kaasatud veel ka sünteniin ning sündekaan, mis seostudes ESCRT kompleksi valkudega TSG101 (ingl k. *tumor susceptibility gene 101*) ja Alix, toetavad samuti luumenisisesesse vesiikuli pungumist ja eraldumist (Baietti jt., 2012). Universaalseteks eksosoomi valkudeks võib pidada Rab perekonna valke, kuuma šoki valke, adhesiooni molekule, anneksiine ja tetraspaniine ning neis on laialt levinud lipiidid sfingomüeliin, tseramiid ja kolesterool (Record jt., 2011). Eksosoomi iseloomustavate markervalkudena kasutatakse tihti tetraspaniine CD63, CD81 ja CD9 (György jt., 2011). Hoolimata eksosoomide erinevast biogeneesist osalevad ka nemad, sarnaselt mikrovesiikulitele (kolmas rakuväliste vesiikulite tüüp), rakkudevahelises suhtlemises ning informatsiooni horisontaalses ülekandes.



Joonis 2. Eksosoomide biogenees. Endotsütoosi tulemusena tekkinud varajasest endosoomist (ingl. k. *early endosome*, EE) moodustub multivesikulaarne keha (MVK). MVK membraani sissesopistumise teel tekivad luumenisisesed vesiikulid (ingl. k. *intraluminal vesicles*, ILV), mille moodustumisel ja valkude vesiikulitesse suunamisel osalevad ESCRT valgud, lipiidised parved ja tseramiidid. Küpsed MVK-d võivad liikuda lüsoosomaalsesse ratta, kus nad lagundatakse või ühineda plasmamembraaniga, sekreteerides Rab GTPaaside poolt reguleerituna rakuvälisesse keskkonda eksosoomi. Modifitseeritud (Bellingham jt., 2012) järgi.

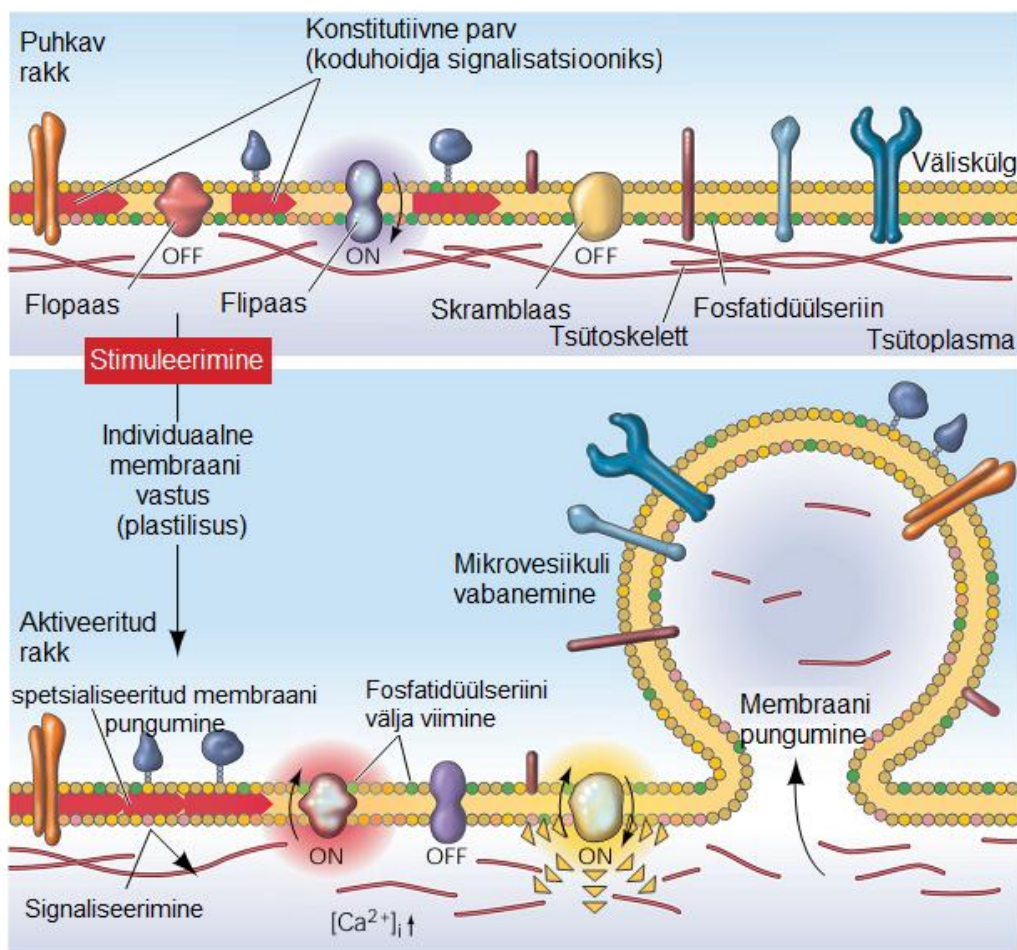
1.1.3. Mikrovesiikulid

Esimesed tööd, mis ilmusid rakkude poolt sekreteeritavate vesiikulite kohta, kirjeldasid tegelikult vaid ühte rakuväliste vesiikulite gruppi, mida nüüd tähistatakse üldnimetusega mikrovesiikulid. Neid sarnase biogeneesiga vesiikuleid on nimetatud üsna erinevalt, olenevalt sellest, mis rakkudest nad pärit on. Esmakirjeldaja P. Wolf kasutas 1967. aastal nimetust „trombotsüütide tolmu“, kuid see nimetus kadus kui ilmusid esimesed tõendid nende olulisusest trombotsüütide füsioloogias. Hiljem on mikrovesiikuleid kirjeldades kasutatud järgmisi nimetusi: ektosoomid – pärit neutrofiilidest (Stein ja Luzio 1991) ja fibroblastidest (Lee jt., 1993); pungunud (ingl. k. *shedding*) vesiikulid – pärit kasvaja rakkudest (Shedden jt., 2003); pungunud kehad (ingl. k. *shedding bodies*) – pärit neurosekretoorsetest rakkudest (Cocucci jt., 2007); mikropartiklid ja mikrovesiikulid – pärit vere monotsüütidest (MacKenzie jt., 2001) ja trombotsüütidest (Crespin jt., 2009) ning eksovesiikulid – pärit dendriit rakkudest (Obregon jt., 2006). Selliseid nimetusi võib tihti kohata ka alles hiljuti ilmunud artiklites, rõhutamaks mikrovesiikulite päritolu.

Mikrovesiikulid võib oma suuruse poolest paigutada apoptootiliste kehade ja eksosoomide vahele. Nende diameeter on ligikaudu 100-1000 nm (György jt., 2011). Siiski on vereplasmast leitud ka 100-st nm-st väiksema diameetriga mikrovesiikuleid (György jt., 2011). Mikrovesiikulite heterogeensus tekitab probleeme siis, kui vesiikulite eraldamine põhineb nende erineval suurusel. Kui vesiikulite puhastamisel käsitleda 100 nm-st väiksemaid vesiikuleid üksnes kui eksosoomi, siis võivad tulemused olla ebatäpsed, sest vesiikulite kogu populatsioon võib sisaldada ka väikeste mõõtmetega mikrovesiikuleid. Seega tuleb suhtuda varem avaldatud eksosoomi käsitlevatesse töödesse tõsise kriitikaga, sest eksosoomide ja mikrovesiikulite eraldamine põhines tihti vaid nende suuruse erinevusel. Selle tõttu arvestatakse viimasel ajal mikrovesiikulite ja eksosoomide eristamisel ka nende muid parameetreid. Kui apoptootilisi kehi ja mikrovesiikuleid saab teineteisest tihti eristada vaid DNA ja histoonide olemasolu alusel, siis eksosoomid erinevad neist nii biogeneesi kui molekulaarse koostise poolest.

1.1.3.1. Mikrovesiikulite tekkemehhanism

Mikrovesiikulid on pärit normaalsetest rakkudest, aga neid võivad sekreteerida ka kahjustatud või kasvaja rakud (Giusti jt., 2013). Nende pungumine rakkude plasmamembraanist on füsioloogiline protsess, mis on seotud rakkude kasvu ja aktiveerumisega. Pungudes haaravad nad kaasa materjali raku plasmamembraanist ja tsütoplastmast. Mõningane konstitutiivne mikrovesiikulite pungumine võib toimuda ka puhkavast rakust, kuid nende sekretsioon suureneb tunduvalt raku aktiveerumisel. Mikrovesiikulite sekretsiooni suurendavad näiteks lahustuvad antagonistid nagu Ca^{2+} -ioonid (Allan jt., 1976) ja forboolester, mis aktiveerib proteiin kinaas C-d (Sidhu jt., 2004), aga ka hüpoksia, kiiritus (Wysoczynski ja Ratajczak 2009), aktiveeritud komplementide kaskaad (Sims jt., 1988) ning survestress (Miyazaki jt., 1996). Klassikalise käsitluse järgi toimub plasmamembraani pungumine ja mikrovesiikuli vabanemine fosfolipiidide asümmeetria kadumise kaudu raku plasmamembraanis (Joonis 3).



Joonis 3. Plasmamembraani vastus raku stimuleerimisele ja sellele järgnev mikrovesiikuli pungumine. Puhkavates rakkudes tagavad fosfatidülseriini paiknemise plasmamembraani sisemises kihis aktiveeritud ensüüm flipaas ning inaktiveeritud ensüümid flopaas ja skramblaas. Kaltsiumi ionide tõus raku aktiveerumisel muudab olukorra vastupidiseks, inaktiveerides flipaasi ning aktiveerides flopaasi ja skramblaasi, tuues kaasa plasmamembraanis fosfolipiidide asümmeetria kadumise, tsütoskeleti ümberkorraldumise ning mikrovesiikuli pungumise plasmamembraanist. Modifitseeritud (Hugel jt., 2005) järgi.

Puhkeolekus tagab kolme ensüümi, milleks on flipaas, flopaas ja skramblaas, koostoime fosfolipiidide nagu fosfatidülseriin (PS) ja fosfatidüületanolamiin (PE) paiknemise plasmamembraani sisemises kihis. Aktiivne flipaas transpordib fosfolipiide plasmamembraani välimisest kihist sisemisse (Seigneuret ja Devaux 1984), kusjuures inaktiveeritud flopaas ei saa fosfolipiide välimisse kihti tagasi liigutada (Connor jt., 1992). Ensüüm skramblaas on puhkavates rakkudes samuti inaktiivne, kuid võib aktiveerunud rakkude plasmamembraanis transportida fosfolipiide mõlemas suunas (Comfurius jt., 1996). Raku aktiveerumisel kutsub Ca^{2+} ionide tõus tsütoplasmas esile flipaasi inhibeerimise ning flopaasi ja skramblaasi

aktiveerimise. Selle tulemusena transporditakse fosfolipiidid plasmamembraani sisemisest kihist välismisse, sattudes nii ka moodustuva mikrovesiikuli pinnale (Bettache jt., 1998).

Kaltsiumi ionide kontsentratsiooni tõus aktiveerib ka papainaaside perekonda kuuluva tsüsteiin-proteinaas kalpaiini, mis hüdrolyüsib aktiiniga seondunud valke, lõhkudes nii aktiini ja plasmamembraanis paiknevate glükoproteiinide vahelisi sidemeid. See võimaldab tsütoskeleti ümberkorraldumist ja mikrovesiikuli välja sopistumist (Fox jt., 1990). Näiteks on trombotsüütidest leitud vaid neile iseloomulik ensüüm gelsoliin, mis lõikab aktiini katvaid valke (McLaughlin jt., 1993) ja osaleb selle kaudu raku tsütoskeleti ümberkorraldamises ja vesiikuli moodustumises. Mikrovesiikulite tekke klassikalise mehhanismi kõrval on viimasel ajal pälvinud tähelepanu asjaolu, et paljude endoteeli rakkudest pärit vesiikulite pinnal PS hoopis puudub (Shet jt., 2003). See annab alust oletada, et osade vesiikulite teke on põhjustatud vaid tsütoskeleti ümberkorraldustest. Nii võib mikrovesiikuli pungumine ja sellest tulenevalt ka vesiikuli suurus olla otseses sõltuvuses tema rakulisest päritolust.

1.1.3.2. Mikrovesiikulite molekulaarne koostis

Siiani pole täpselt teada, millise mehhanismi abil toimub valkude ja teiste molekulide pakkimine mikrovesiikulitesse, küll on aga ilmunud esimesed tööd, mis kinnitavad, et tegemist on väga täpselt reguleeritud protsessiga. Praeguseks on näidatud, et mikrovesiikulite pungumine toimub raku plasmamembraani kindlatest kohtadest, mis on rikastunud rakutüübile omaste, sinna valikuliselt paigutatud valkude ja lipiididega (Cocucci jt., 2007; Moskvich ja Fishelson 2007). Oletatakse, et sellised domeenid tekivad mittesekretoorsete vesiikulite ühinemisel plasmamembraaniga, mille tulemusel tagatakse tsütosoolist pärit valitud valkude pakkimine punguvatesse mikrovesiikulitesse (Cocucci jt., 2007, 2009). Sellises mikrovesiikuli tekke- ja sorteerimisprotsessis osalevad olulise komponendina ka plasmamembraanis paiknevad kolesteroolirikkad mikrodomeenid – lipiidised parved (Del Conde jt., 2005). Need mikrodomeenid on seotud ka eksosoomide biogeneesiga (De Gassart jt., 2003), mistõttu nad ei ole ainuomased mikrovesiikulite moodustamisele.

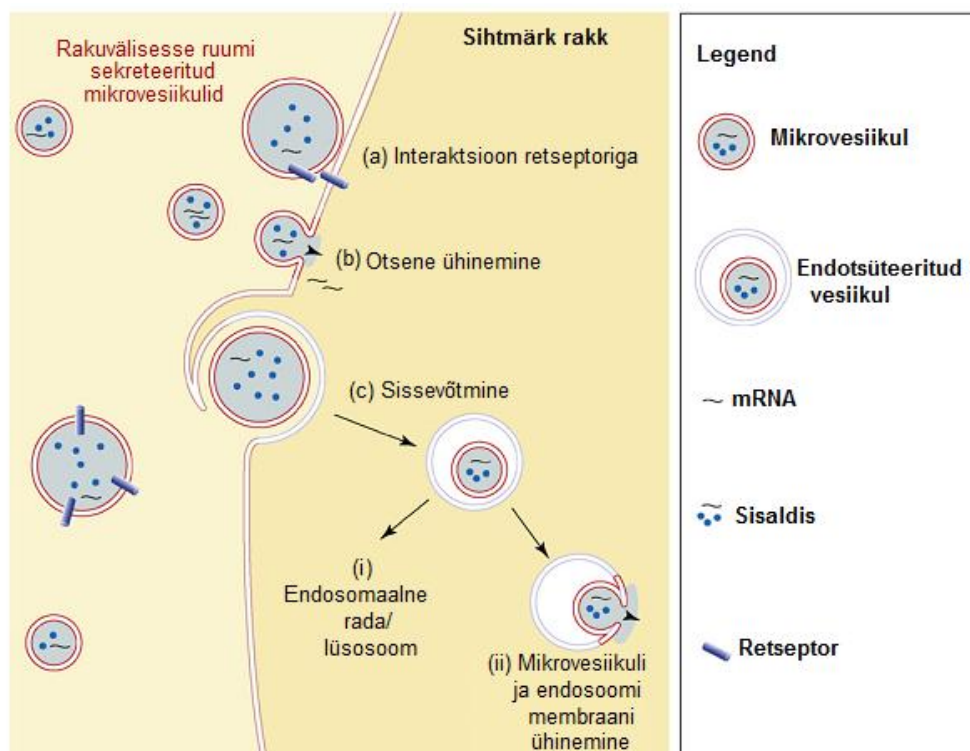
Kuivõrd ühe ja sama raku poolt sekreteeritud mikrovesiikulid ja eksosoomid on erineva biogeneesiga, siis erinevad nad ka molekulaarselt koostiselt. Üheks olulisemaks erinevuseks on see, et eksosoomide membraan on rikastatud teatud kindlate valkudega, näiteks tetraspaniinidega, mida saab uuringutes kasutada kui eksosoomide markereid. Mikrovesiikulitel selline unikaalne markervalk puudub. Neid iseloomustatakse pigem

doonorrakule iseloomulike lipiidide ja valkude kaudu, mida mikrovesiikul pungudes kaasa haarab. Nii võib mikrovesiikuleid tuvastada konkreetsele rakutüübile, millest mikrovesiikul pärit on, omase markervalgu kaudu või mõne valgu abil, mida on rakkude pinnal palju (György jt., 2011). Mikrovesiikuli sisaldised ja tema membraani molekulaarne muster olenevad seega vahetult sellest, millist tüüpi ja millises seisundis rakust see vesiikul pärineb.

1.1.3.3. Mikrovesiikulite funktsioonid

Sarnaselt enamusele rakuvälistele vesiikulitele on mikrovesiikulite põhilisteks funktsioonideks bioaktiivsete molekulide transport doonorrakust eemalasuvatesse sihtkohtadesse. Mikrovesiikulite funktsioonid sõltuvad otseselt sellest, milliseid molekule nad sisaldavad ehk millistest rakkudest on nad pärit. Paljude rakkudest eralduvate mikrovesiikulite terviklikkus kaob kiiresti, nad lagunevad ning nende sisaldised ja vähemalt osa membraanist vabanevad rakuvälisesse keskkonda. Selline mehhanism on eriti oluline kasvaja rakkudest pärit mikrovesiikulite puhul, mis vabastavad lagunemisel oma membraanis asuva ekstratsellulaarse maatriksi metalloproteinaasi indutseerija (EMMPRIN), stimuleerides ümbritsevates fibroblastides maatriks metalloproteinaaside tootmist. Selle tulemusena rakke ümbritsev ekstratsellulaarne maatriks lagundatakse ja kasvajarakkude liikuvus suureneb tunduvalt (Sidhu jt., 2004). Vesiikuli lagunemine tagab signaalmolekulide vabanemise rakuvälisesse ruumi, vabastades ka selliseid tsütosooli valke, millel puudub signaaljärjestus. Näiteks MacKenzie jt (2001) kirjeldasid esimesena põletikku soodustava tsütokiini interleukiin-1 β pakkimist monotsüütide poolt sekreteeritavatesse mikrovesiikulitesse.

Suur osa rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulitest osaleb erinevate rakutüüpide vahel toimivas signaalide ülekandes, omades nii olulist rolli rakkudevahelises suhtlemises. On näidatud, et mikrovesiikulite poolt vahendatud informatsiooni ülekanne ei toimu juhuslikult, vaid on täpselt reguleeritud protsess. Nimelt lähterakkudest sekreteeritud mikrovesiikulid ei seostu mitte iga rakuga, millega nad kokku puutuvad, vaid ainult nende sihtmärkrakkudega, mille nad spetsiifiliselt ära tunnevad. Näiteks seostuvad trombotsüütidest pärit mikrovesiikulid küll monotsüütidega, aga mitte neutrofiilidega (Lösche jt., 2004). Mikrovesiikulite seostumine võib toimuda ka mitmete erinevate rakkudega. Näiteks seostuvad aktiveeritud neutrofiilidest pärit mikrovesiikulid nii trombotsüütide (Pluskota jt., 2008), makrofaagide (Gasser ja Schifferli 2004) kui ka dendriitrakkudega (Eken jt., 2008).



Joonis 4. Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakuga. Doonorrakude poolt rakuvälisesse ruumi sekreteeritud mikrovesiikulid võivad: (a) seostuda sihtmärkrakule spetsiifiliste pinnaretseptorite vahendusel; (b) ühineda sihtmärkraku plasmamembraaniga, viies oma sisaldised, kaasaarvatud mRNA, tsütosooli või (c) saada endotsüteeritud sihtmärkrakkude poolt (Joonisel näidatud makropinotsütoosi vormina). Mikrovesiikuli jõudmisele raku tsütosooli võib järgneda: (i) endotsüteeritud vesiikuli äratundmine lüsoosoomi poolt ja suunamine endosomaalsesse ratta või (ii) mikrovesiikuli ja endosoomi membraani ühinemise järel mikrovesiikuli sisaldise vabanemine raku tsütosooli. Noole otsad näitavad vesiikuli membraani ja sihtmärgi membraani ühinemisele järgnevat vesiikuli sisaldise vabanemist. Modifitseeritud joonis (Cocucci jt., 2009).

Mikrovesiikuli ja sihtmärkraku seostumine sõltub enamasti sellest, millise sihtmärkrakule mõeldud informatsiooni edasikandmiseks see konkreetne vesiikul on mõeldud. Mikrovesiikuli ja raku seostumine võib toimuda kolmel viisil – (a) vesiikuli seostumine plasmamembraanis paikneva retseptoriga, (b) vesiikuli- ja plasmamembraani ühinemine ning (c) vesiikuli rakku sissevõtmine (Joonis 4). Mikrovesiikuli seostumine sihtmärkraku plasmamembraanis oleva retseptoriga võib piirduda ainult retseptorvahendatud signaali ülekandega, mis aktiveerib retsipientrakus konkreetsed signaalrajad. Näiteks demonstreerisid Barry jt (1999), et trombotsüütide mikropartiklite membraanis oleva arahhidoonhappe abil on võimalik monotsüütides aktiveerida kolme erinevat MAP kinaasi (p42/p44 MAPK, p38 ja JNK) rada. Vesiikuli seostumisel plasmamembraanile järgneb enamasti kas tema rakku sissevõtmine või

vesiikuli membraani ja plasmamembraani ühinemine. Membraanide ühinemisel kantakse doonoraku pinnalt pärit plasmamembraani komponendid nagu retseptorid ja ligandid üle retsipientraku plasmamembraani koosseisu (Janowska-Wieczorek jt., 2001). Samuti vabanevad vesiikulisse pakitud tsütosooli komponendid ja segunevad sihtmärkraku tsütosooliga. Nii on võimalik ühest rakust teise kanda valke, mRNA-d ja miRNA-d ning sel viisil mõjutada otseselt retsipientraku fenotüüpi, funktsioone või muid omadusi (Deregibus jt., 2007; Eken jt., 2008; Yuan jt., 2009). Kui mikrovesiikul on jõudnud raku endosoomi, siis võib järgneda tema ja endosoomi membraani ühinemine ning sisaldiste vabanemine tsütosooli. Samas võidakse vesiikul saata ka muutumata kujul lüsoosoomi lagundamisele (Cocucci jt., 2009; Faille jt., 2012).

1.2. Embrüo implantatsioon

Rasedus on kompleksne protsess, mis hõlmab üksteisele järgnevaid sündmusi alates embrüo implantatsioonist, detsiidua ja platsenta moodustumisest kuni lapse sünnini. Iga etapi edukas läbimine on vajalik eeltingimus järgmise etapi alustamiseks. Implantatsioonile eelneb nn pre-implantatsiooni staadium, mille käigus endomeetrium muutub embrüole vastuvõtlikuks ning blastotsüsti areng jõuab staadiumi kus ta on võimeline endomeetriumile kinnituma. Pre-implantatsiooni staadiumis toimub embrüo rakkude lõigustumine, mille jooksul moodustuvad looteks arenev sisemine rakumass ehk embrüoblast ning väline trofektoderm, mis võimaldab embrüonaalsel koel seonduda emaka endomeetriumiga. Sellel perioodil toimuvad biokeemilised ja morfoloogilised muutused endomeetriumi stroomas ning epiteelis, mille tagajärjel muutub ta blastotsüstile vastuvõtlikuks. Endomeetriumi rakkude diferentseerumise käigus suureneb nii endomeetriumi näärmete sekretsiooni võime kui ka ekstratsellulaarse maatriksi valkude tootmine emaka epiteeli rakkude poolt. Neist muutustest paljud alluvad hormonaalsele regulatsioonile ja toimuvad iga normaalse menstruaaltsükli ajal olenemata rasedusest. Lisaks toodab raseduse varajases etapis arenev blastotsüst faktoreid, mis tõstavad veelgi endomeetriumi vastuvõtlikust (Van Sinderen jt., 2013).

Menstruaaltsükli kesk-sekretoorses faasis järgneb luteiniseeriva hormooni järsule tõusule ja langusele 4-5 päeva pikkune periood, mida nimetatakse implantatsiooni aknaks, mille ajal endomeetriumi suurenenud vastuvõtlikkus kattub hetkega, millal blastotsüst on valmis endomeetriumile kinnituma (Sarani jt., 1999). Väljaspool seda perioodi implantatsiooni ei toimu või on blastotsüsti kinnitumine defektne. On näidatud, et ligikaudu 30% raseduse

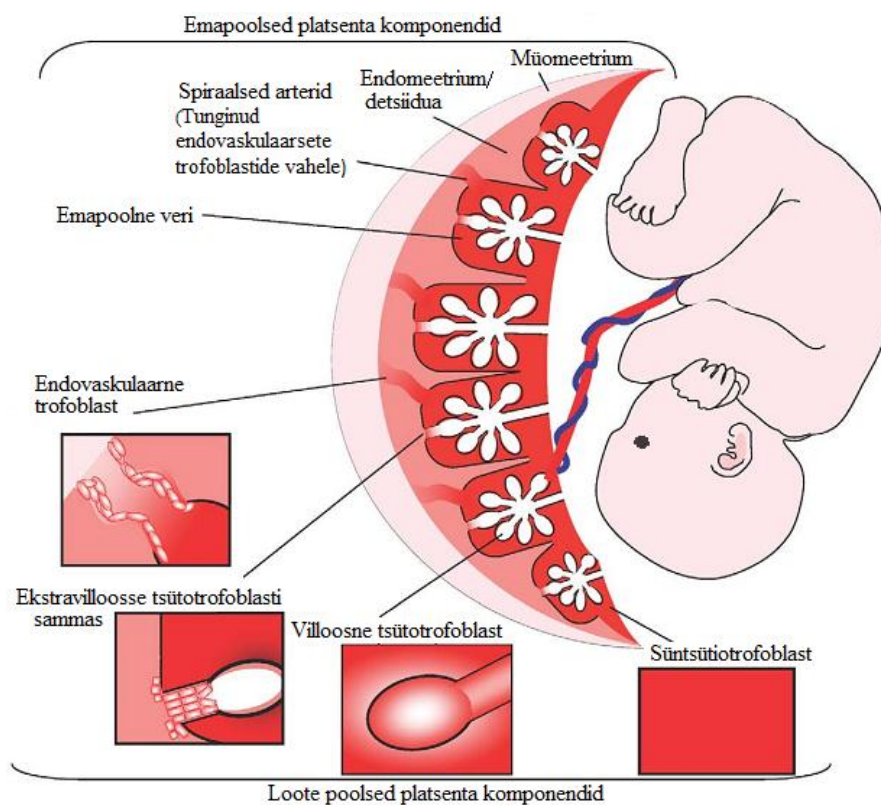
varajastest katkemistest võivad olla tingitud just blastotsüsti implantatsiooni häiretest (Macklon jt., 2002). Implantatsiooni protsess algab 6-7 päeva peale viljastumist (Sarani jt., 1999) ja selle võib jagada kolmeks faasiks. Esimeseks etapiks on apositsioon, mille käigus kinnitub blastotsüst emaka seinale veel ebastabiilselt. Selles staadiumis seostuvad emaka epiteelirakkude pinnal paiknevad pinopoodid blastotsüsti süntsüütiotrofoblastide pinnal olevate mikrohattudega. Seejärel tugevneb kontakt emaka epiteelirakkude ja blastotsüsti rakkude vahel. Viimaseks staadiumiks on invasioon, mille käigus trofoblasti rakud tungivad ja migreeruvad läbi emaka epiteeli detsiiduasse, jõudes müomeetriumi välimise kihini ja emaka veresoonkonnani. Nii tagatakse loote ja platsenta ankurdamine emaka endomeetriumi külge ning piisav verevahetuse ema ja loote vahel (M. Singh jt., 2011).

1.2.1. Platsenta moodustumine

Implantatsiooni käigus moodustuv platsenta reguleerib ema organismi ja loote vahelist ioonide ja metaboliitide transporti ning loote jääkproduktide eraldamist, võimaldades seeläbi loote arengut. Platsenta moodustumine on keeruline protsess, mis hõlmab embrüo arengu käigus tekkinud trofektodermi rakkudest pärinevate trofoblasti rakkude jagunemist, diferentseerumist, invasiooni ja seostumist emaka detsiidua rakkudega. Platsenta moodustumisel tekivad rakkude diferentseerumise kaudu kaks erinevat trofoblasti tüüpi. Villooset tüüpi tsütotrofoblasti rakud jäävad basaalmembraaniga ühendatuks ja moodustavad ühekihilise epiteeli, mis moodustab funktsionaalse barjääri ema vereringe ja lootekoe vahel (Joonis 5). Ühetuumaliste tsütotrofoblasti rakkude liitumise tulemusena tekivad multituumsed süntsüütiotrofoblastid. Need rakud on vahetus kontaktis ema verega ning osalevad ema organismi ja loote vahelises molekulide ülekandes ning platsenta funktsioonide endokriinses regulatsioonis. Ekstravillooset tüüpi tsütotrofoblasti rakud liiguvad detsiiduasse ja müomeetriumis, et ümber kujundada endomeetrium ja selle veresoonkond. Mõned ekstravilloossed tsütotrofoblasti rakud (endovaskulaarne trofoblast) võivad tungida ka emaka arterioolidesse, asendades seal endoteeli rakke ja tekitades madala toonusega ja suure diameetriga veresooni (Malassiné ja Cronier 2002).

Siiani pole päris täpselt teada, mis kontrollib trofoblastide liikumist ümbritsevate rakkude suhtes. Tõenäoliselt on trofoblastide liikumine kompleksne protsess, mida reguleeritakse nii molekulide kui ka rakuliste struktuuride omavahelise toime kaudu. Regulatsioonis võivad osaleda näiteks adhesiooni molekulid, ekstratsellulaarse maatriksi valgud ja maatriksit lagundavad metalloproteinaasid (MMP). Adhesiooni molekulidest on väga olulised näiteks

integriinid, mis otseselt reguleerivad trofoblastide liikumist. On näidatud, et esimese trimestri villoossetel tsütotrofoblastidel ekspresseerub $\alpha 6 \beta 4$ integriin, mis on laminiin 332 retseptor. Kui trofoblastide arengu käigus tekivad ekstravillooset tüüpi rakud, siis need liiguvad villoosset basaalmembraanist välja, neil reguleeritakse alla $\alpha 6 \beta 4$ integriini tase ning nad hakkavad ekspresseerima fibronektiini retseptorit, milleks on $\alpha 5 \beta 1$ integriin ja laminiini/kollageeni retseptorit $\alpha 1 \beta 1$ integriini (Damsky jt., 1994). Häired eelnimetatud integriinide ekspressiooni ümberlülitamises takistavad trofoblastide liikumist detsiiduasse ja põhjustavad raseduse komplikatsioone, milleks on pre-eklampsia (Zhou jt., 1993). Oluline osa on ka emapoolsel mikrokeskkonnal, mis soodustab trofoblastide piisavat invasiooni detsiidua rakkude vahele, kuid samas hoiab ära liigse invasiooni (Burrows jt., 1996; Xu jt., 2002).



Joonis 5. Ema organismi ja lootelise päritoluga platsenta komponendid. Ema organismist pärit platsenta komponendid on müomeetrium, endomeetrium/detsiidua, spiraalsed arterid ja emapoolne veri. Lootelise päritoluga on hatted ääristav villoosne tsütotrofoblastide ning neid kattev, ema verrega vahetult kokku puutuv paljutuumne süntsütiotrofoblastide piirkond. Joonisel on esitatud ka ekstravilloosetest tsütotrofoblastidest moodustunud sammas ning ema organismi arterioolidesse tunginud endovaskulaarsete trofoblastide ala. Modifitseeritud joonis (Frost ja Moore 2010) järgi.

1.2.2. Trofoblasti ja endomeetriumi rakkude vaheline suhtlus

Samaaegseid muutusi, mis toimuvad embrüonaalsetes kudedes ja endomeetriumi koes pre-implantatsiooni perioodil reguleeritakse suures osas nendest kudedest pärit rakkude omavahelise suhtlemise kaudu. Embrüo koe ja ema organismi rakkude vahelist suhtlust võiks jagada nõ „süsteemseks ja lokaalseks vestluseks“. Süsteemse suhtluse puhul toimub informatsiooni vahetus vereringe ja erinevate kudede kaudu. Näiteks liigub inimesel trofoblasti rakkude poolt sekreteeritav inimese koorioni gonadotropiin (hCG) vereringe vahendusel munasarja ning stimuleerib progesterooni tootmist kollaskehas, kontrollides selle kaudu endomeetriumi arengut ning toetades embrüo implanteerumist (Fujiwara 2006). Lisaks sellele on näidatud, et suguhormoonid östrogeen ja progesteroon osalevad ka blastotsüsti integreerimise ekspresseerumise reguleerimises (Basak jt., 2002). On leitud ka, et raseduse varasel etapil toimub areneva embrüo ja emaorganismi kudede vahel otsene suhtlus, mida nimetatakse embrüo ja ema vaheliseks „kohalikuks vestluseks“. Selles protsessis kasutatakse suurt hulka loote algme ja ema organismi endomeetriumi poolt sekreteeritud bioloogilisi molekule, näiteks kemokiine, tsütokiine, adhesioonimolekule ja kasvufaktoreid, mis tagavad blastotsüsti normaalse kinnitumise endomeetriumi. Kui nimetada mõnda olulisemat, siis näiteks interleukiini 1 β sekretsioon on arvatavasti esimene blastotsüsti vastus retseptiivsele endomeetriumi ning lisaks veel endomeetriumi poolt sekreteeritavad LIF (ingl. k. *Leukemia inhibitory factor*), interleukiin 6 (IL6) ja interleukiin 11 (IL11). Kasvufaktoritest võib välja tuua transformeeriva kasvufaktori β (ingl. k. *Transforming growth factor- β*), epidermaalse kasvufaktori perekonna (EGF) ning insuliini sarnase kasvufaktori perekonna valgud (M. Singh jt., 2011).

1.2.2.1. Trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite osa ema organismi ja loote vahelises suhtluses

Viimastel aastatel on embrüo ja ema organismi kudede vahelise suhtlemise uurimisel huviorbiiti tõusnud rakkude poolt sekreteeritavad vesiikulid ning seal hulgas ka mikrovesiikulid. Raseduse korral sekreteerivad trofoblasti rakud ümbritsevasse keskkonda mikrovesiikuleid. On näidatud, et võrreldes normaalse raseduse teise trimestriga tõuseb kolmanda trimestri jooksul süntsüütiotrofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulite (STBM) hulk märkimisväärselt (Germain jt., 2007). Mikrovesiikulite hulga olulist tõusu on märgata ka raseduskomplikatsioonide, näiteks pre-eklampsia, puhul (Reddy jt., 2008). Seetõttu enamikus uuringutes võrreldakse mikrovesiikuleid normaalse ja komplitseeritud

raseduse korral, mis võimaldaks tuvastada, millist osa mängivad trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid raseduse kulgemises. Nii on näidatud, et STBM-d osalevad platsenta ja ema organismi kudede vahelises suhtluses, mõjutades põletiku kulgemist ja veresoonkonna häirete reguleerimist. Kõige enam on uuritud STBM-te rolli pre-eklampsia korral. Pre-eklampsia on multisüsteemne häire, mille puhul platsenta moodustumisel veresoonkond areneb ebanormaalselt, sünnitus toimub enneaegselt, loote sünnieelne kasv on pärsitud ning komplikatsioonid võivad lõppeda nii ema kui lapse surmaga (Sibai jt., 2005). Rasedatel, kellel areneb välja pre-eklampsia suureneb süntsüütiotrofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulite hulk ning samal ajal väheneb endoteeli rakkude aktiivsus (Knight jt., 1998) ja häirub nende talitus (VanWijk jt., 2002), mis on üheks teguriks ka pre-eklampsia kujunemisel. Lisaks on leitud, et pre-eklampsia korral võivad veres ringlevad STBM-d võimendada põletikku, seostudes monotsüütidele ja stimuleerides põletikueelsete tsütokiinide nagu TNF- α (ingl. k. *tumor necrosis factor α*), interleukiin 12p70 ja interleukiin 18 teket ning samal ajal inhibeerida interferoon- γ (IFN- γ) teket (Germain jt., 2007). STBM-d võivad samuti suurendada interleukiinide IL-8, IL-6 ja IL-1 β teket ning reguleerida üles adhesioonimolekuli CD54 ekspressiooni (Messerli jt., 2010).

Enamuses uuringutes on kirjeldatud mikrovesiikulite osalemist raseduse hilisemas faasis ja nende seotust raseduse komplikatsioonidega. Põhiliselt on uuritud just mikrovesiikulite seostumist immuun- ja endoteelirakkudega, mis võiks selle kaudu reguleerida erinevaid rasedusega seotud protsesse. Senini on tähelepanu alt välja jäänud pre-implantatsiooni staadiumis toimuv trofoblasti ja endomeetriumi vaheline suhtlemine, mis tegelikult võib osutuda määravaks blastotsüsti endomeetriumile kinnitumisel. Esimene sellesisuline töö ilmus 2013. a alguses, kus Ng jt näitasid, et endomeetriumi rakkude poolt sekreteeritud eksosoomid ja mikrovesiikulid sisaldavad miRNA-sid, mis kontrollivad implantatsiooniks oluliste geenide ekspressiooni. Sellest lähtuvalt võib arvata, et endomeetriumi rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite sissevõtmine trofektodermi või epiteeli rakkudesse võib olla implantatsiooni õnnestumiseks määravava tähtsusega (Ng jt., 2013). Vastassuunalist informatsiooni ülekannet ehk seda kas ja kuidas trofoblasti rakkudest pärit eksosoomid ja mikrovesiikulid mõjutavad endomeetriumi rakke ning võimalik, et reguleerivad sel viisil embrüo implanteerumist, pole aga siiani lähemat uuritud.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli esiteks kirjeldada trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 poolt sekreteeritud vesiikulite valgulist koostist ning teiseks uurida trofoblasti mikrovesiikulite võimalikku osalemist trofoblasti ja endomeetriumi vahelises suhtlemises.

Eesmärgi saavutamiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Eraldada JAR ja JEG-3 rakkude poolt kasvukeskkonda sekreteeritud mikrovesiikulid.
2. Leida trofoblasti mikrovesiikulitele iseloomulik pinnavalk, mis oleks kasutatav nende vesiikulite tuvastamiseks.
3. Kirjeldada mikrovesiikulite valgulist koostist.
4. Teostada mikrovesiikulite proteoomika andmete analüüs, selleks et klassifitseerida neis paiknevaid valke funktsioonide alusel.
5. Teha kindlaks, kas trofoblasti mikrovesiikuleid võetakse sisse endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkudesse ning milline võiks olla sisenemise mehhanism.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Kasutatud antikehad

2.2.1.1. Western blot analüüsil kasutatud antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Kasutatud lahjendus
Primaarsed antikehad			
inimese integriin beeta 4 vastane hiire MAK 450-9D	Lifespan biosciences, USA	1 mg/ml	1:100
inimese CD63 vastane hiire MAK MEM-259	Abcam, UK	1 mg/ml	1:10000
inimese integriin alfa 6 vastane küüliku MAK EPR5578	Lifespan biosciences, USA	Hübridoomidelt eraldatud sööde	1:5000
Negatiivse kontrolli antikeha			
hiire IgG isotüüpide segu	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,4 mg/ml	1:1000
Sekundaarsed antikehad			
määrõika peroksüdaasiga seotud hiire immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Thermo Scientific, USA	0,8 mg/ml	1:5000
määrõika peroksüdaasiga seotud küüliku immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Thermo Scientific, USA	0,8 mg/ml	1:5000

2.2.1.2. Läbivoolu tsütofluorimeetrias kasutatud antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Kasutatud lahjendus
Primaarsed antikehad			
inimese integriin beeta 4 vastane hiire MAK 450-9D	Lifespan biosciences, USA	1 mg/ml	1:25
inimese CD63 vastane hiire MAK MEM-259	Abcam, UK	1 mg/ml	1:500
inimese integriin alfa 6 vastane hiire MAK CBL458	Millipore, USA	0,1 mg/ml	1:200
Negatiivse kontrolli antikeha			
hiire IgG isotüüpide segu	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,4 mg/ml	1:200

Sekundaarne antikeha			
hiire immunoglobuliinide vastase kitse PAK F(ab') ₂ fragmendid, seotud Alexa Fluor 647-ga	Molecular Probes, USA	2 mg/ml	1:200

2.2.1.3. Immunofluorestsentsmikroskoopias kasutatud antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Kasutatud lahjendus
Primaarne antikeha			
inimese integriin beeta 4 vastane hiire MAK 450-9D	Lifespan biosciences, USA	1 mg/ml	1:25
Sekundaarne antikeha			
hiire immunoglobuliinide vastase kitse PAK F(ab') ₂ fragmendid, seotud Alexa Fluor 647-ga	Molecular Probes, USA	2 mg/ml	1:200

2.2.2. Kasutatud rakuliinid

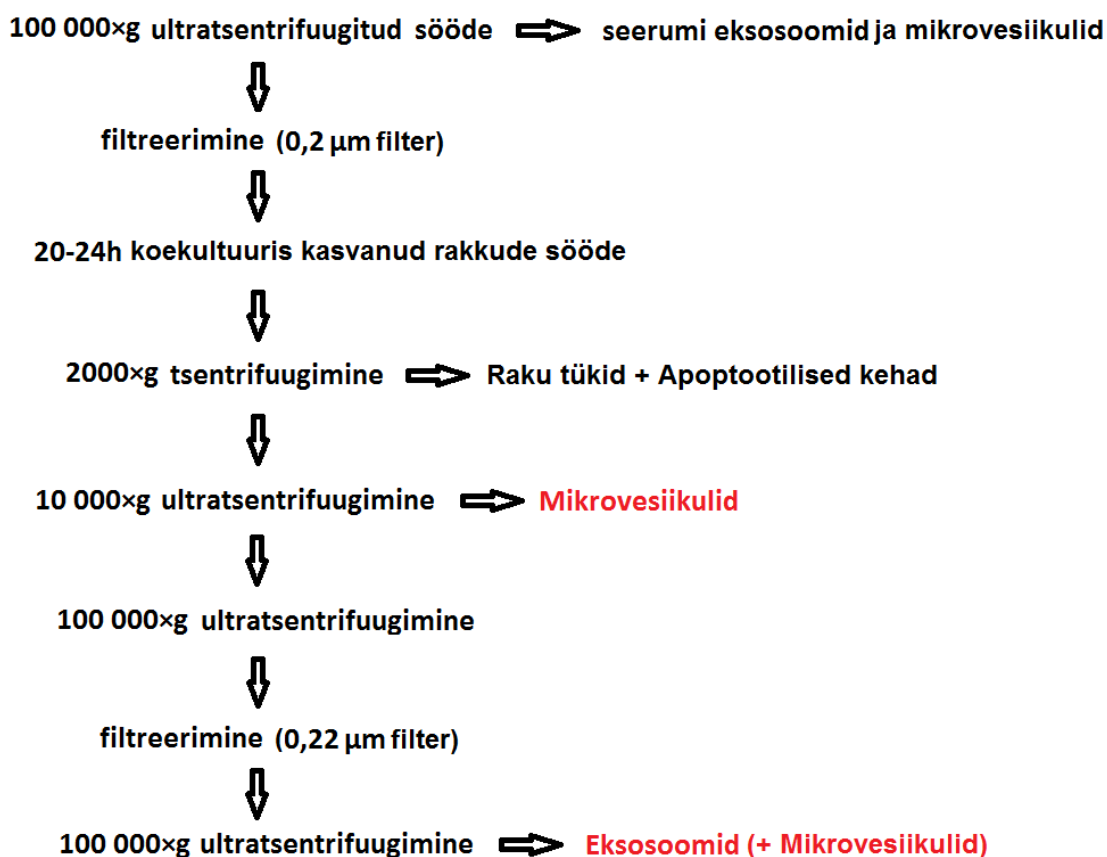
Käesolevas töös kasutati kahte inimese platsenta koorioni kartsinoomi rakuliini JAR ja JEG-3, inimese endomeetriumi kartsinoomi rakuliini RL95-2 ning melanoomi rakuliini C32.

JAR ja JEG-3 rakuliine kasvatati RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) söötmes (PAA Laboratories, Austria), mille mahust oli 10% veise loote seerum (FCS, ingl. k. *foetal calf serum*) (PAA Laboratories, Austria) ning millele lisati 100 µg/ml streptomütsiini ja 100 U/ml penitsilliini. RL95-2 ja C32 rakuliine kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes (PAA Laboratories, Austria), mille mahust oli 10% veise loote seerum ning millele lisati samuti penitsilliini ja streptomütsiini (Invitrogen, USA). RL95-2 rakkude söötmesse lisati ka inimese insuliini (Invitrogen, USA) lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Kõiki rakke kasvatati 5% CO₂ juuresolekul veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C. Rakkude ümberkülvamiseks pesti neid üks kord steriilse 1×PBS-iga ning eemaldati plastikult trüpsiiniga või 1×PBS-iga, mis sisaldas 10 mM EDTA-d. Trüpsiini mõju inhibeeriti, lisades trüpsiini lahusega võrdses mahus seerumit sisaldavat söödet (RPMI 1640+10% FCS). Rakud sadestati tsentrifuugides (tsentrifuug 4K15C, Sigma) 10 minuti

jooksul 350×g ja 20°C juures. Rakke passeeriti 2-3 päeva järel, mil nad olid saavutanud 100%-lise konfluentsuse.

2.2.3. Mikrovesiikulite ja eksosoomide eraldamine

Mikrovesiikulid ja eksosoomid eraldati JAR ja JEG-3 rakkude kasvukeskkonnast meetodil, mille aluseks on vesiikulite suuruse ja tiheduse erinevused. See meetodika hõlmab erinevaid tsentrifuugimise ja ultratsentrifuugimise etappe (Joonis 6), mille tulemusena eralduvad erineva suurusega vesiikulid erinevatesse fraktsioonidesse (Théry jt., 2001).



Joonis 6. Mikrovesiikulite ja eksosoomide eraldamise etapid. Punasega on märgitud materjal, mida kasutati edasises töös.

Söödet, milles kasvatati trofoblasti rakke (RPMI 1640+10% FBS), tsentrifuugiti enne rakkudele kandmist 1 tund 100 000×g juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti, Beckman, USA) eraldamaks söötimest mikrovesiikulid ja eksosoomid, mis võisid sinna sattuda veise seerumist. Peale tsentrifuugimist sööde filtreeriti (filtri poori läbimõõt 0,2 µm; Thermo Scientific, USA) ning kasvatati selles rakke 20-24 tundi. Seejärel rakkudelt sööde eemaldati ning tsentrifuugiti (tsentrifuug 4K15C, Sigma) 20 minutit 2000×g ja 4°C juures, selleks et

eraldada surnud rakkude tükid ja apoptootilised vesiikulid (Turiák jt., 2011). Mikrovesiikulite eraldamiseks tsentrifuugiti eelmainitud söödet 10 000×g ja 4°C juures 1 tund (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti). Selleks, et eemaldada vesiikulite külge kleepunud söötme valke pesti sadenenud materjali 1×PBS-ga ning sadestati uuesti 16 100×g (tsentrifuug 5415R, Eppendorf, Saksamaa) ja 4°C juures 10 min. Sadestatud vesiikulid suspendeeriti PBS-s ja säilitati -80°C juures või lüüsi lüüsilahuses (vaata punkt 2.2.5.).

Eksosoomid eraldati mikrovesiikulite sademelt eemaldatud supernatandist tsentrifuugides seda 100 000×g juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti) 1 tund temperatuuril 4°C. Sadenenud vesiikulid suspendeeriti ja filtreeriti (filtri poori läbimõõt 0,22 µm; Millipore, USA) ning tsentrifuugiti uuesti 1 tund 100 000×g juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor SW41Ti) temperatuuril 4°C. Saadud vesiikulite sade suspendeeriti PBS-s ja säilitati -80°C või lüüsi lüüsilahuses (vaata punkt 2.2.5.).

2.2.4. Vesiikulite keskmise diameetri mõõtmine

10 000×g ja 100 000×g juures sadestatud vesiikulite keskmised diameetrid mõõdeti Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) abil. Tulemusi analüüsiti kasutades tarkvarapaketi R'i versiooni 2.15.2.

2.2.5. Rakkude, mikrovesiikulite ja eksosoomide lüüsimine

Petri tassidel kasvavaid rakke pesti kõigepealt üks kord steriilse 1×PBS-iga ning eemaldati siis plastikult 1×PBS-ga, mis sisaldas 10 mM EDTA-d. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel ja pesti veel 3 korda 1×PBS-ga. Nii rakud, kui kasvukeskkonnast eraldatud vesiikulid lüüsi 1 tunni jooksul 50 mM TrisHCl puhvril (pH 7,5), millele lisati 1% Triton X-100, inhibiitorite kokteil (Roche Diagnostics GmbH, Šveits) ning 1 mM PMSF-i (fenüülmetüülsulfonüülfluoriid). Seejärel töödeldi lüüsilahuses olevat rakususpensiooni 2×15 sekundit ultraheliga (Cole-Parmer, USA) ning tsentrifuugiti 16 100×g (tsentrifuug 5415R, Eppendorf, Saksamaa) ja 4°C juures 10 min. Supernatant eraldati ja säilitati -20°C juures.

2.2.6. Valkude SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforees ja Western blot analüüs

Rakkude ja vesiikulite lüsaadid segati Laemmli proovipuhvriga ning kuumutati 5 minutit 100°C juures. Redutseerivaid tingimusi nõudvate valguproovide puhul kasutati ditiotreitooli

sisaldavat proovipuhvrit. Valgud lahutati 6%- või 12%-lise SDS-polüakrüülamiidgeeli abil ning kanti sellelt PVDF membraanile (polüvinülideenfluoriid; Immobilon, Millipore, USA) nn „märja“ ülekande meetodil 1 tunni jooksul 100 V volulupinge juures. Antikehade mittespetsiifilise seostumise vältimiseks inkubeeriti membraane 1 tund 1×PBS-s, mis sisaldas 0,1% Tween-20 ja 5% lõssipulbrit (nn blokeerimisegu). Seejärel toimus membraanide inkubeerimine 1 tunni jooksul primaarsete antikehadega, mis olid lahjendatud blokeerimissegus. Järgnevalt pesti membraane kolm korda 15 minutit 1×PBS-ga, milles oli 0,1% Tween-20 ning inkubeeriti 1 tund sekundaarsete antikehadega blokeerimissegus. Lõpuks pesti membraane kolm korda 15 minutit 1×PBS-ga, milles oli 0,1% Tween-20 ja inkubeeriti 5 minutit kemoluminestsentsi esilekutsuvas lahuses (Millipore, USA) ning eksponeeriti röntgenfilmile (Agfa, Belgia). Film ilmutati vastavalt etteantud protokollile (Agfa, Belgia).

2.2.7. Läbivoolu tsütofluorimeetriline analüüs

Läbivoolu tsütofluorimeetrilisel analüüsil kasutati erinevaid protokolle sõltuvalt sellest, kas uuriti üksnes rakkude ja vesiikulite pinna valke või siis sisemisi ja pinna valke samaaegselt.

Rakkude või vesiikulite pinnavalkude uurimiseks pesti neid 1×PBS-ga ja hoiti 15 minutit jääl blokeerimissegus (PBS + 0,4% EDTA + 2% kitse seerum). Esiteks inkubeeriti rakke või vesiikuleid primaarse antikehaga 30 minutit jääl, pesti 2 korda pesulahusega (PBS + 0,4% EDTA + 1% BSA) ja inkubeeriti seejärel sekundaarse antikehaga 30 minutit jääl pimedas. Primaarne antikeha lahjendati blokeerimissegus ja sekundaarne antikeha pesulahuses. Negatiivse kontrollina kasutati primaarsele antikehale vastavat kogust hiire IgG isotüüpide segu või ainult sekundaarset antikeha. Peale sekundaarse antikehaga inkubeerimist pesti rakke pesulahusega ja suspendeeriti 1×PBS-s.

Rakkude ja vesiikulite pinnal või sisemuses paiknevate valkude tuvastamiseks fikseeriti neid 4%-lise formaldehüüdi lahuses ja pesti seejärel permeabiliseerimise puhvriga (nn Perm puhver) (eBioscience, USA) ja jäeti 30 minutiks blokeerimissegusse (Perm puhver, milles oli 2% kitse seerumit). Kõigepealt inkubeeriti rakke/vesiikuleid primaarse antikehaga 30 minutit toatemperatuuril, seejärel pesti rakke 2 korda Perm puhvriga ja inkubeeriti sekundaarse antikehaga 30 minutit toatemperatuuril pimedas. Primaarne antikeha lahjendati blokeerimissegus ja sekundaarne antikeha Perm puhvril. Peale sekundaarse antikehaga inkubeerimist pesti rakke Perm puhvriga ja suspendeeriti 1×PBS-s.

Läbivoolu tsütoflourimeetri abil määrati igas proovis uuritavat antigeeni kandvate rakkude arv sama ajapunkti negatiivse kontrolli (st uuritavat antigeeni äratundev antikeha oli asendatud vastava loomaliigi IgG seguga või ainult vastava sekundaarse antikehaga) suhtes. Hilisemal andmete analüüsil paigutati nn “värav” negatiivse kontrolli histogrammile nii, et 0,5% rakkudest loeti positiivseks. See võimaldas andmekogumist välja jätta võimalikud valepositiivsed sündmused. Rakkude ja mikrovesiikulite analüüs teostati läbivoolutsütomeetril FACS Aria (BD Biosciences, USA) ning tulemusi analüüsiti Flowing Software 2.5.0 (Turku Centre for Biotechnology, Soome) tarkvara abil.

2.2.8. Mikrovesiikulite mass-spektromeetria

Mikrovesiikulite lüsaatide mass-spektromeetiline analüüs teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Proteoomika tuumiklaboris.

Mikrovesiikulitest tuvastatud valkude võimalikku paiknemist rakus, nende molekulaarseid funktsioone ja rolli bioloogilistes protsessides analüüsiti rikastusanalüüsiga geeni ontoloogia (GO) kategooriates kasutades veebitööriista David (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Oluliseks loeti kategooriad, mille puhul p-väärtused jäid pärast Bonferroni korrektsiooni väiksemaks kui 0,05. Tulemuste esitamiseks kasutati tarkvarapaketi R'i versiooni 2.15.2.

JAR ja JEG-3 rakkude mikrovesiikulitest mass-spektromeetrilise analüüsi abil tuvastatud valke võrreldi omavahel. Need valgud, mis olid pärit ainult ühe rakuliini vesiikulitest, jaotati kaheks, vastavalt sellele, kas neid oli mass-spektromeetrias tuvastatud vähemalt viie või vähem kui viie peptiidi abil. Kõiki valke, mida tuvastati vähemalt 5 peptiidi alusel, võrreldi andmebaasis *Vesiclepedia* (<http://www.microvesicles.org/>) esitatud valkudega ja trofoblasti rakkudest antikehade abil tuvastatud valkudega, mis leiti andmebaasist *The human protein atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>). Venni diagrammide tegemiseks kasutati veebikeskkonda venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

2.2.9. Trofoblasti rakuliinidest JAR ja JEG-3 pärit mikrovesiikulite sisenemine endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkudesse

2.2.9.1. Mikrovesiikulite märgistamine

JAR ja JEG-3 rakkude kasvukeskkonnast eraldatud mikrovesiikulid märgistati lipiidi värviga FM 1-43 (N-(3-trietüülammooniumpropüül)-4-(4-dibutüülamiino)stürüül)püridiinium dibromiid) (Molecular Probes, USA) või mikrovesiikulite pinnavalgu vastase antikehaga.

Antikehaga märgistamiseks hoiti mikrovesiikuleid 15 minutit jääl blokeerimissegus (PBS + 0,4% EDTA + 2% kitse seerum) ja inkubeeriti seejärel primaarse antikehaga 30 minutit samuti jääl. Peale seda pesti mikrovesiikuleid 2 korda pesulahusega (PBS + 0,4% EDTA + 1% BSA) ja inkubeeriti sekundaarse antikehaga 30 minutit jääl, pimedas. Primaarne antikeha lahjendati blokeerimissegus ja sekundaarne antikeha pesulahuses. Peale sekundaarse antikehaga inkubeerimist pesti mikrovesiikuleid pesulahusega, sadestati tsentrifuugimise teel ja suspendeeriti üles IMDM söötmes.

Mikrovesiikulite märgistamiseks lisati nende suspensioonile PBS-s FM 1-43 värvi (lahjendus 1:2000) ja hoiti 5 minutit jääl. Sellele järgnevalt sadestati mikrovesiikulid tsentrifuugimise teel ja suspendeeriti üles IMDM söötmes.

2.2.9.2. Märgistatud mikrovesiikulite sissevõtmine retsipientrakku

Mikrovesiikulite märklaudrakkudena kasutati RL95-2 rakke ja kontrollina melanoomi C32 rakke, mis külvati 24-kannulistesse plaatidesse arvestusega 100 000 rakku kannu kohta. Immunoflorestsentsmikroskoopia jaoks külvati rakud 24-kannulise plaadi põhja asetatud 12 mm läbimõõduga klaasidele (Marienfeld GmbH & Co. KG, Saksamaa). Rakke kultiveeriti 2 päeva. Seejärel pesti rakke steriilse PBS-ga. Sihtmärkrakkudele lisati FM 1-43 värviga märgistatud, filtreeritud (filtri poori läbimõõt 0,8 µm; Thermo Scientific, USA) ja läbivoolu tsütofluorimeetri FACSAria (BD Biosciences, USA) abil loendatud mikrovesiikulid. Ühe proovi kohta võeti kas ~200 000 või ~400 000 märgistatud mikrovesiikulit. Rakke inkubeeriti mikrovesiikulitega 1 tunni jooksul kas 4°C või 37°C juures. Peale inkubeerimist eemaldati rakkudelt mikrovesiikuleid sisaldav sööde ja rakke pesti steriilse PBS-ga. Seejärel inkubeeriti rakke elusatele rakkudele mõeldud tuumavärviga Hoechst (1 µg/ml) (Thermo Scientific, USA) 30 minuti jooksul 37°C juures, selleks et tuua nähtavale raku tuumad.

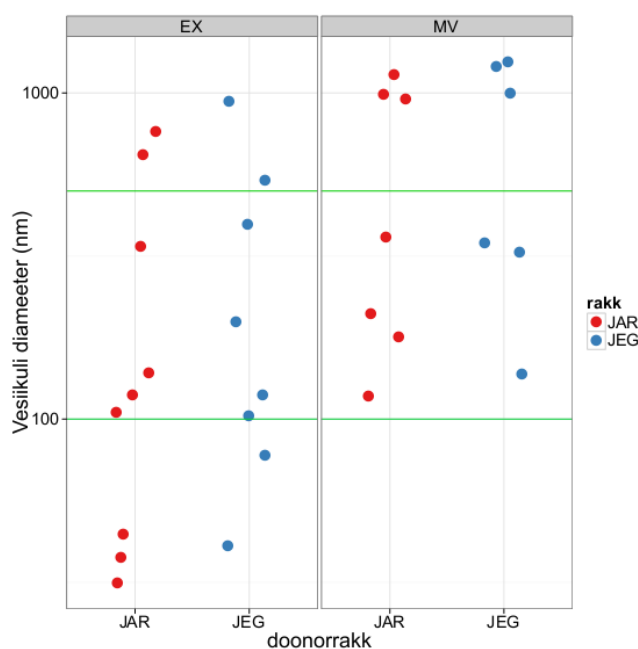
Immunofluorestsentsmikroskoopia jaoks pesti rakke üks kord 1×PBS-ga ning sulundati fluorestsentsi pleekimist vähendavasse preparaati Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, USA). Preparaate analüüsiti konfokaalmikroskoobiga Olympus FluoView TM FV1000. Saadud kujutiste töötlemiseks kasutati arvutiprogrammi Imaris (Bitplane, Šveits).

Läbivoolu tsütofluorimeetriliseks analüüsiks eraldati rakud plastikult 1×PBS-iga, mis sisaldas 10 mM EDTA-d. Rakud sadestati tsentrifuugimise teel ja suspendeeriti PBS-s. Saadud tulemusi analüüsiti Flowing Software 2.5.0 tarkvara abil ja esitati tarkvarapaketi R'i versiooni 2.15.2 abil.

2.3. Tulemused

2.3.1. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite suuruse mõõtmine

Uurimaks, kui suured on trofoblasti rakuliini rakkude poolt kasvukeskkonda sekreteeritud vesiikulid, mõõdeti nende keskmised diameetrid (Joonis 7). Selgus, et 10 000×g juures sadestatud vesiikulite diameetrid olid suure varieeruvusega, jäädes vahemikku 100-1000 nm. Veel enam, hoolimata eelnevast filtreerimisest (filtri poori diameeter 0,22 µm) tuvastati 100 000×g juures sadestatud materjalist väga heterogeense suurusega osakesi (diameetriga 30-1000 nm).



Joonis 7. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude kasvukeskkonnast eraldatud vesiikulite keskmised suurus. Joonise vasakus tulbas on esitatud 100 000×g juures eraldatud vesiikulite (eksosoomid, EX) ja paremas 10 000×g juures eraldatud vesiikulite (mikrovesiikulid, MV) jaotus diameetri järgi. X-teljel on märgitud trofoblasti rakuliin, mille kasvukeskkonnast vesiikulid eraldati (JAR-punane ja JEG-3 sinine). Y-teljel on logaritmilises skaalas märgitud vesiikuli diameeter nanomeetrites. Alumine roheline joon vastab 100 nm ja ülemine roheline joon 500 nm piirile.

2.3.2. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite markervalku otsimine

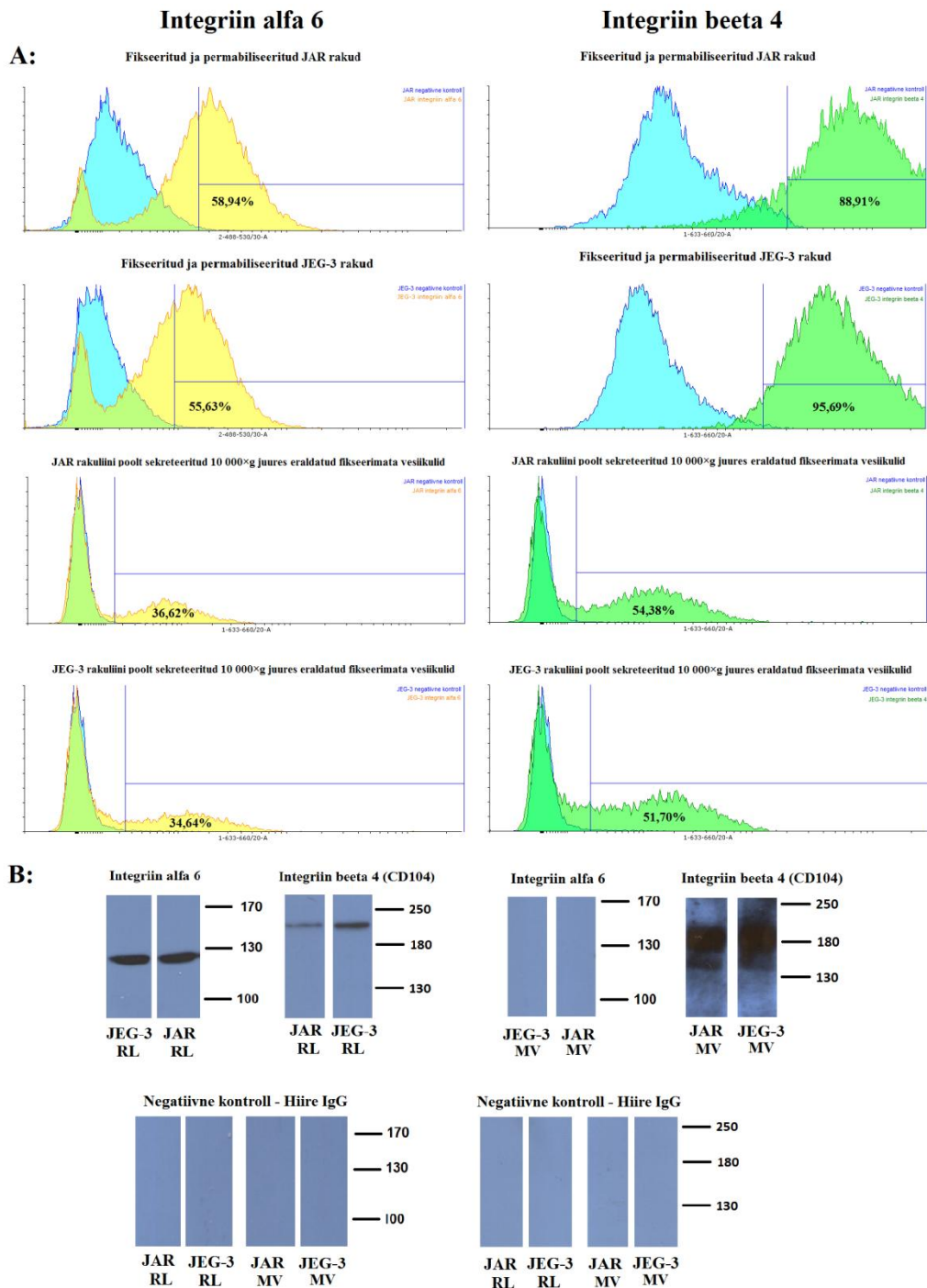
Tulenevalt eesmärkidest seati tingimuseks, et valk, mida võiks pidada mikrovesiikulite markeriks peaks esinema vähemalt 75% JAR ja JEG-3 rakkudel ning vähemalt pooltel nende

rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulitel. Oluline oli ka, et potentsiaalne markervalk ekspresseeruks mikrovesiikuli membraanis, võimaldades neid eristada teistest vesiikulitest üksnes pinnavalkude abil.

2.3.2.1. JAR ja JEG-3 rakuliinidest pärit mikrovesiikulite markervalgu leidmine

JAR ja JEG-3 rakkudest pärit mikrovesiikulite markervalgu leidmiseks analüüsiti nii tervete rakkude kui ka nende poolt sekreteeritud ja 10 000×g juures sadestatud mikrovesiikulite valgulist koostist. Mikrovesiikulite võimalikuks markervalgu kandidaadiks valiti integriin $\alpha 6\beta 4$. Edasises töös uuriti selle integriini mõlema ahela ekspressiooni trofoblasti rakkudes ja mikrovesiikulites (Joonis 8). Läbivoolu tsütofluorimeetri abil uuriti nii fikseeritud ja permabiliseeritud rakke kui ka fikseerimata, terveid mikrovesiikuleid (Joonis 8.A). Eesmärgiks oli leida kui suur on uuritava integriini ahelaid ekspresseerivate rakkude hulk rakkude kogu populatsioonist. Selgus, et 59% JAR rakkudest sisaldab integriin $\alpha 6$ ahelat ja 89% rakkudest integriin $\beta 4$ ahelat. JEG-3 rakuliini puhul saadi analoogsed tulemused: 56% rakkudest sisaldas integriin $\alpha 6$ ahelat ja 96% integriin $\beta 4$ ahelat. Selleks, et veenduda, kas need valgud sobiks ka mikrovesiikulite markervalguks, märgistati permabiliseerimata mikrovesiikuleid neile valkudele seostuvate antikehadega. Leiti, et kõnealune integriin $\alpha 6$ ahel on vaid 37% JAR ja 35% JEG-3 rakkudest pärit mikrovesiikulite pinnal. $\beta 4$ ahela suhtes olid positiivsed 54% JAR ja 52% JEG-3 rakuliini mikrovesiikulitest. Uuritud integriini ahelate suhtes positiivsete rakkude ja mikrovesiikulite hulk oli mõlemas rakuliinis sarnane.

Läbivoolu tsütofluorimeetria tulemuste kinnitamiseks lüüsi JAR ja JEG-3 rakud ning nendest pärit mikrovesiikulid. Saadud lüsaatide valgud lahutati SDS-PAGE abil, kanti üle PVDF membraanile *Western blot* meetodil ning teostati immunoanalüüs integriini $\alpha 6\beta 4$ ahelate vastaste antikehadega. Mõlema rakuliini puhul tõid antikehad nähtavale valgutriibu, mis vastab $\alpha 6\beta 4$ integriini uuritavatele ahelatele (Joonis 8.B). Seevastu kummagi rakuliini mikrovesiikulite proovis ei olnud näha $\alpha 6$ ahelale vastavat valgutriipu ning $\beta 4$ ahela hinnanguline molekulmass oli eeldatavast väiksem. Saadud tulemustest lähtuvalt valiti trofoblasti mikrovesiikulite markervalguks $\alpha 6\beta 4$ integriini $\beta 4$ ahel.

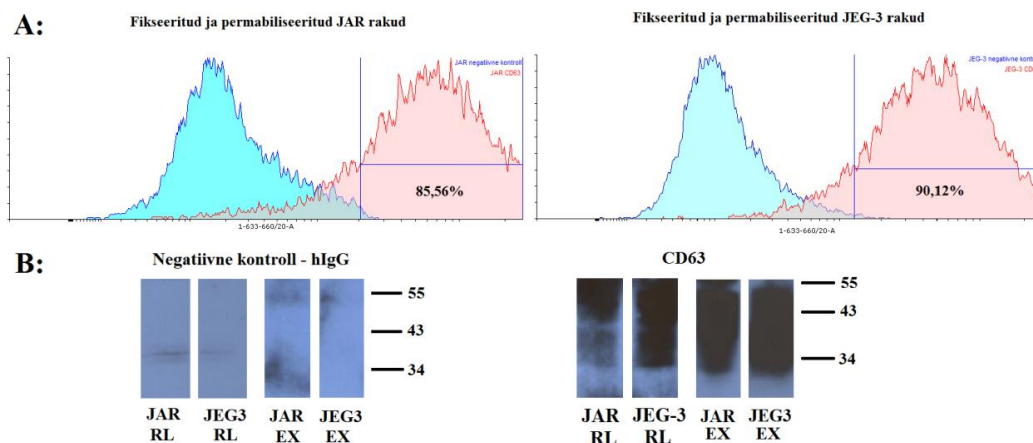


Joonis 8. Integriin $\alpha\beta 4$ subühikute tuvastamine JAR ja JEG-3 rakkudes ning 10 000×g juures sadestatud mikrovesiikulites läbivoolu tsütofluorimeetria, geelelektroforeesi ja immunoblotti meetoditega. (A) Integriini $\alpha\beta 4$ ahelad tuvastati JAR ja JEG-3 rakkudes ning nendest pärit mikrovesiikulites vastavate antikehadega läbivoolu tsütofluorimeetri abil. Tsütofluorimeetria tulemused on esitatud negatiivse kontrolli ja uuritava valgu ülekattuvate histogrammidena. Positiivsete sündmuste hulk kogu sündmuste hulgast on esitatud protsentidena. **(B)** JAR ja JEG-3 rakkude ning mikrovesiikulite immunoblot analüüs $\alpha\beta 4$ integriini ahelate vastaste antikehadega. RL-rakulüsaat; MV-mikrovesiikulite lüsaat. Negatiivseks kontrolliks oli hiire IgG isotüüpide segu.

2.3.2.2. Eksosoomide markervalgu CD63 tuvastamine JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud ja 100 000×g juures sadestatud vesiikulites

JAR ja JEG-3 rakkudest sekreteeritud eksosoomide markervalgu leidmiseks kasutati nii terveid rakke kui nende poolt sekreteeritud ja 100 000×g juures sadestatud vesiikuleid. Eksosoomide markervalguks valiti tetraspaniin CD63, mille olemasolu JAR ja JEG-3 rakkudes tuvastati läbivoolu tsütofluorimeetri abil ning ka SDS-PAGE ja immunoblot meetodil. Eksosoomid on läbivoolu tsütofluorimeetrilise analüüsi jaoks liiga väikesed, mistõttu CD63 olemasolu uuriti 100 000×g juures eraldatud vesiikulite puhul ainult SDS-PAGE ja immunoblot meetodil.

Läbivoolu tsütofluorimeetriline analüüs tuvastas, et 86% JAR ning 90% JEG-3 rakkudest on CD63 antigeeni suhtes positiivsed (Joonis 9.A). Tsütofluorimeetria andmete kontrollimiseks analüüsiti rakkude ja vesiikulite valgulüsaate SDS-PAGE ja immunoblot meetodil kasutades CD63 vastast antikeha (Joonis 9.B). Immunoblot kinnitas tsütofluorimeetria tulemusi, tuues mõlema rakuliini puhul nähtavale valgutriibu, mille asukoht vastas CD63 hinnangulisele molekulmassile (30-50 kDa). Samasuguse molekulmassiga valgutriip oli näha ka 100 000×g juures sadestatud vesiikulite puhul, mis olid eeldatavasti valdavalt eksosoomid. Toetudes saadud tulemustele võib CD63 pidada trofoblasti eksosoomide markervalguks.

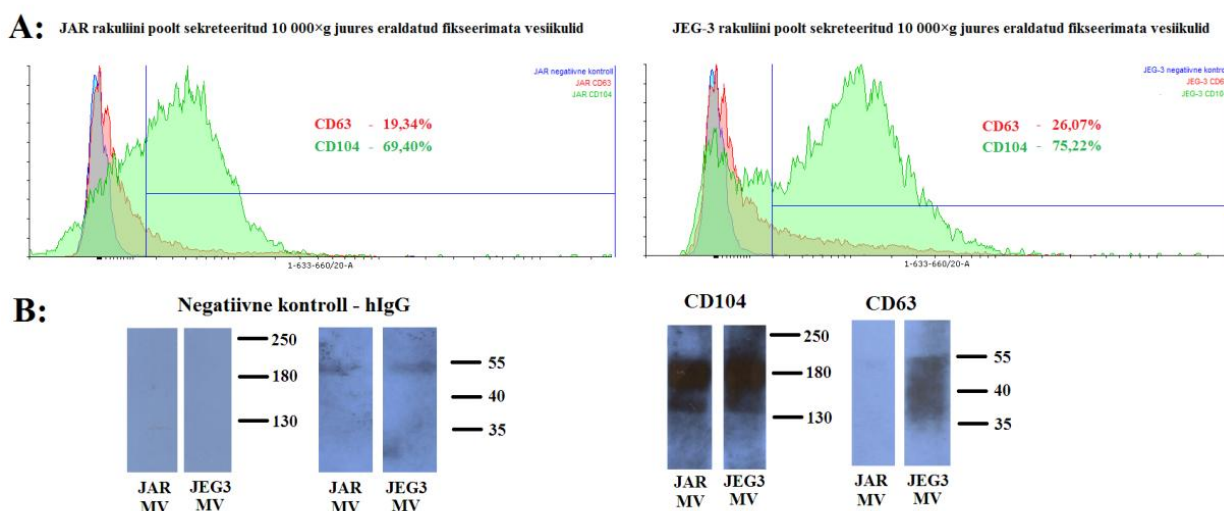


Joonis 9. CD63 ekspressioon JAR ja JEG-3 rakkudes ja 100 000×g eraldatud eksosoomides. (A) Tetraspaniini CD63 ekspressioon JAR ja JEG-3 rakkudes tuvastati läbivoolu tsütofluorimeetri abil kasutades vastavaid antikehi. Tsütofluorimeetria tulemused on esitatud negatiivse kontrolli ja CD63 ekspressiooni ülekattuvate histogrammina. Positiivsete sündmuste hulk kogu sündmuste hulgast on esitatud protsentidena (B) Rakkude ja eksosoomide valgulüsaatide analüüs CD63 vastaste antikehadega immunoblotti meetodil. RL-rakulüsaat; EX-eksosoomide lüsaat. Negatiivseks kontrolliks oli hiire IgG isotüüpide segu.

2.3.2.3. Eksosoomide markervalku ekspressiooni kontroll 10 000×g juures sadestatud vesiikulitel

Selleks, et veenduda kas 10 000×g juures sadestatud vesiikulid on põhiliselt integriin $\beta 4$ ahela suhtes positiivsed, kuid samas ei ekspresseeri CD63 kui eksosoomide markerit, kasutati läbivoolu tsütofluorimeetria puhul mõlema markervalku vastaseid antikehi ning analoogne kontroll teostati ka immunoblot meetodil. Selgus, et 69% JAR rakkudest pärit vesiikulitest kandis pinnal $\beta 4$ (CD104) ahelat ja vaid 19% CD63 valku (Joonis 10.A). JEG-3 rakkudest pärit vesiikulitest 75% kandsid pinnal $\beta 4$ ahelat ja 26% CD63 valku.

Tsütofluorimeetria tulemused leidsid kinnitust ka immunoblot meetodiga. Lüüsitud vesiikulite valgud lahutati SDS-PAGE abil, kanti üle PVDF membraanile, mida töödeldi CD104 ja CD63 vastaste antikehadega (Joonis 10.B). Integriin $\beta 4$ ahelale vastav valgutriip oli mõlema rakuliini vesiikulite lüsaadi puhul samasugune. Seevastu JAR rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite lüsaadis CD63 valku ei tuvastatud ning JEG-3 vesiikulite lüsaadi puhul oli valgutriip väga nõrk.

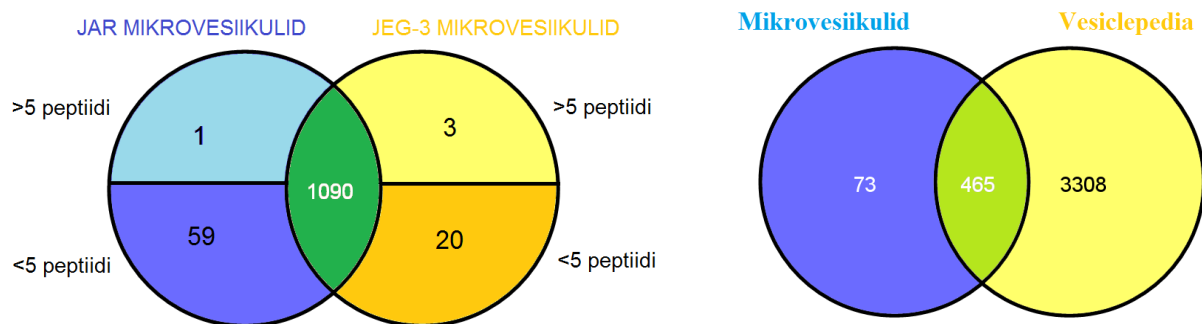


Joonis 10. JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite segust, mis sadestati 10 000×g juures, tuvastati mikrovesiikulid integriin $\beta 4$ ahela ja eksosoomid CD63 valgu kaudu. (A) Integriini $\beta 4$ ahela ja tetraspaniini CD63 olemasolu tuvastati vastavate antikehadega läbivoolu tsütofluorimeetria abil. Tsütofluorimeetria tulemused on esitatud negatiivse kontrolli ja markervalkude ülekattuvate histogrammidena. Positiivsete sündmuste hulk kogu sündmuste hulgast on esitatud protsentidena (B) Rakkude ja 10 000×g juures sadestatud vesiikulite valkude analüüs CD63 ja integriin $\beta 4$ ahela vastaste antikehadega immunoblot meetodil. MV-mikrovesiikulite lüsaat. Negatiivseks kontrolliks oli hiire IgG isotüüpide segu.

2.3.3. Mikrovesiikulite mass-spektromeetria

Mikrovesiikulite mass-spektromeetrilise analüüsi tulemusena leiti JAR mikrovesiikulitest 1298 ja JEG-3 mikrovesiikulitest 1260 erinevat valku. Edaspidi vaadeldi ainult selliseid valke, mida oli mikrovesiikulitesse pakitud suuremas hulgas (mass-spektromeetriliselt tuvastatud vähemalt 5 peptiidi). Järgnevalt analüüsiti seetõttu vastavalt 520 JAR ja 449 JEG-3 mikrovesiikulite valku (Lisa 1). Uurimaks, kui sarnased on oma valgulise koostise poolest JAR ja JEG-3 rakkude mikrovesiikulid, võrreldi Venni diagrammi abil mõlema rakuliini kõiki tuvastatud vesiikulite valke (Joonis 11.A). Leiti, et 1090 valku on omased mõlema rakuliini mikrovesiikulitele. JAR mikrovesiikulites oli 60 valku, mis puudusid JEG-3 mikrovesiikulitest ning neist vaid üks – *Dipeptidyl-peptidase 3* (DPP3) tuvastati vähemalt 5 peptiidi abil. JEG-3 mikrovesiikulites oli 23 sellist valku, mida JAR mikrovesiikulitest ei tuvastatud, kuid neist vaid kolm – *Drebrin* (DBN1), *Tumor-associated calcium signal transducer 2* (TACSTD2) ja *Human leukocyte antigen G* (HLA-G) tuvastati vähemalt 5 peptiidi abil. Selgitamaks, kas trofoblasti mikrovesiikulite valke on varem kirjeldatud kui rakuväliste vesiikulite komponente, võrreldi kõiki vähemalt viie peptiidi abil tuvastatud valke *Vesiclepedia* andmebaasis esitatud inimese rakuliinidest või kehavedelikest eraldatud vesiikulite valkudega (Joonis 11.B). Selgus, et 86,4% trofoblasti rakuliinide mikrovesiikulitest leitud valkudest on *Vesiclepedia* andmetel varem teiste rakutüüpide vesiikulites juba tuvastatud.

Selleks, et teada saada, kas trofoblasti mikrovesiikulites tuvastatud valkude olemasolu on ka varem seda tüüpi rakkudes näidatud, kasutati andmebaasi *The human protein atlas*. Selgus, et trofoblasti vesiikulitest leitud valkudest on 85,8% eelnevalt antikehade abil trofoblasti rakkudes tuvastatud, andmebaas ei kinnitanud 7,1% valkude ekspressiooni trofoblastis ja 7,1% valkude kohta puudusid andmed.



Joonis 11. JAR ja JEG-3 rakkude mikrovesiikulite valgulise koostise omavaheline võrdlus mass-spektromeetria andmete põhjal ja võrrelduna andmebaasiga *Vesiclepedia*.

A: JAR ja JEG-3 mikrovesiikulite valgulise koostise võrdlus. Roheline ala tähistab valke, mis on leitud mõlema rakuliini mikrovesiikulitest, kollane ja sinine osa tähistavad ainult ühe rakuliini mikrovesiikulitest leitud valke. Ringide ülemine osa tähistab valke, mida tuvastati rohkem kui 5 peptiidi abil ning alumine osa vähem kui 5 peptiidi abil tuvastatud valke. **B:** Kõigi vähemalt 5 peptiidi alusel tuvastatud valkude võrdlus *Vesiclepedia* andmebaasis kirjeldatud inimese rakuliinidest või kehavedelikest eraldatud vesiikulite valkudega. Ringide roheline ala tähistab valkude ühisosa. Analüüsi tulemused on esitatud Venni diagrammi abil.

2.3.4. Mass-spektromeetria abil tuvastatud mikrovesiikulite valkude analüüs

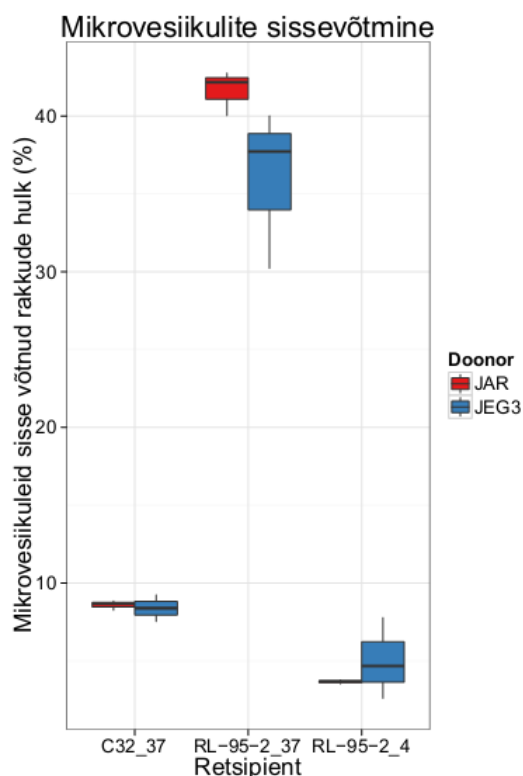
Mass-spektromeetria abil tuvastatud valkude funktsionaalse olemuse hindamiseks kasutati rikastusanalüüse veebikeskkonnas DAVID. Uuriti, millistes raku piirkondades mikrovesiikulitesse pakitud valgud tavaliselt paiknevad ning leiti, et nendeks on plasmamembraan ning tsütosool (Lisa 2). Mõningane kokkulangevus ilmnes ka tsütoskeletiga ja vesikulaarsete kompartmentidega. Teiseks uuriti, millised molekulaarsed funktsioonid võiksid olla mikrovesiikulitest leitud valkudel (Lisa 3). Ilmnes, et paljud neist võiks osaleda erinevat tüüpi nukleiinhapete ja nende komplekside sidumisel. Näiteks osalevad mitmed valgud nukleotiidide, ribonukleotiidide ja nukleosiidide sidumisel, aga ka ATP ning RNA sidumisel. Lõpuks püüti leida, milline võiks olla tuvastatud valkude osa bioloogilistes protsessides (Lisa 4). Selgus, et suur osa valke võiksid olla seotud valkude paiknemise, transpordi ning komplekside tekkega, kuid näiteks leidis ka valke, mis võiksid osaleda translatsiooni protsessis.

2.3.5. Trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkude poolt

Sooviti teada, kas trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid sisenevad endomeetriumi rakkudesse ning kas see võiks toimuda eelistatult just seda tüüpi rakkudesse. Selleks inkubeeriti endomeetriumi rakke ja melanoomi rakke trofoblasti kasvukeskkonnast eraldatud ja märgistatud mikrovesiikulitega. Selgitamaks, kas endomeetriumi rakku võiks siseneda terve mikrovesiikul või toimub hoopis mikrovesiikuli ja raku membraanide ühinemine, inkubeeriti endomeetriumi rakke vesiikulitega erinevatel temperatuuridel. Mikrovesiikulite sisenemist endomeetriumi rakkudesse hinnati läbivoolu tsütofluorimeetria abil ning jäädvustati ka kasutades konfokaalmikroskoopiat.

2.3.5.1. Trofoblasti mikrovesiikulite endomeetriumi rakkudesse sissevõtmise hindamine läbivoolu tsütofluorimeetria abil

Endomeetriumi rakuliini RL95-2 ja melanoomi rakuliini C32 (kasutati kontrollina) rakke inkubeeriti JAR ja JEG-3 rakkudest pärit mikrovesiikulitega 1 tund 37°C juures. Läbivoolu tsütofluorimeetria tulemused (Joonis 12) näitasid, et 37°C juures sisenes endomeetriumi rakkudesse 41,6% JAR ja 35,9% JEG-3 rakkudest pärit mikrovesiikulit kuid melanoomi rakkude puhul oli mikrovesiikulite sisenemise protsent vastavalt 8,6% ja 8,4%. Seega erines mikrovesiikulite sisse võtmine endomeetriumi ja melanoomi rakkudesse olulisel määral ($p < 0,05$). Lisaks uuriti, kas vesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakkudesse toimub ka +4°C juures. Leiti, et sellistes tingimustes sisenes vaid 3,7% JAR-i ja 5,0% JEG-3 lipiidivärviga märgistatud mikrovesiikulitest endomeetriumi rakkudesse. Mikrovesiikulite sissevõtmise erinevus füsioloogilisel ja madalal temperatuuril oli statistiliselt oluline ($p < 0,05$).

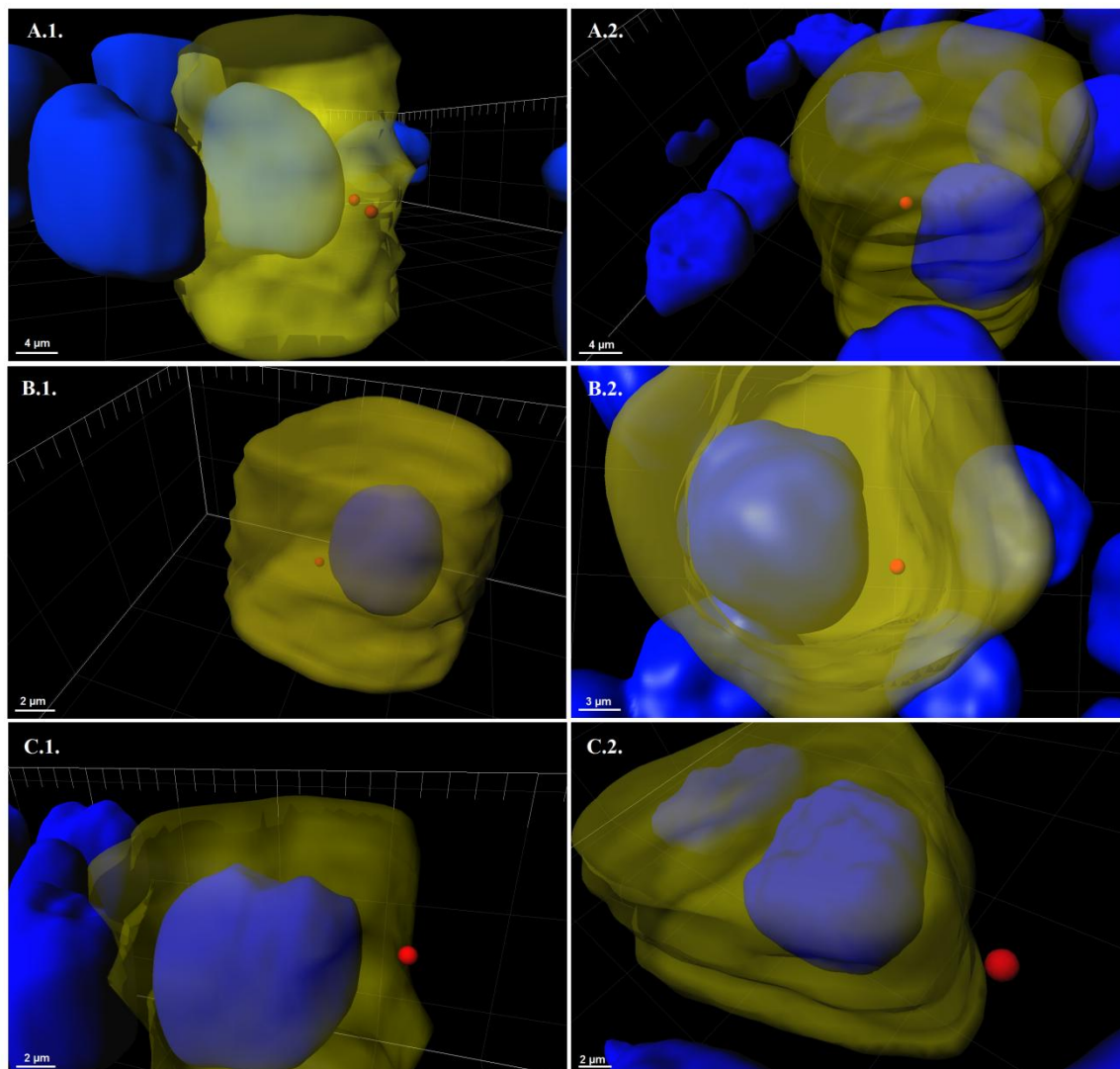


Joonis 12. JAR ja JEG-3 rakkudest pärit mikrovesiikulite endomeetriumi rakuliini RL95-2 ja melanoomi rakuliini C32 rakkudesse sissevõtmise läbivoolu tsütofluorimeetriline analüüs. X-teljel on tähistatud rakuliinid, mida inkubeeriti koos lipiidivärviga märgistatud mikrovesiikulitega, kas 37°C või 4°C juures. Y-teljel on märgitud mikrovesiikuleid sisse võtnud rakkude hulk protsentides. Punane: JAR mikrovesiikulid; sinine: JEG-3 mikrovesiikulid. Katse on tehtud kolmes korduses. Karpdiagrammil tähistavad jooned maksimumi ning miinimumi, karbi servad ülemist ja alumist kvartiili ning joon mediaani.

2.3.5.2. Trofoblasti rakkudest pärit märgistatud mikrovesiikulitega mõjutatud endomeetriumi rakkude immunofluorestsents mikroskoopia

Trofoblasti rakuliinide rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmist endomeetriumi rakkudesse uuriti konfokaalmikroskoopia abil, millega saadud 3D kujutiste põhjal hinnati märgistatud mikrovesiikulite asukohta rakutuuma ja -membraani suhtes. Esialgu inkubeeriti endomeetriumi rakke mikrovesiikulitega, mis olid eelnevalt märgistatud integriin $\beta 4$ vastase antikehaga ning selgus, et märgisega mikrovesiikulid liiguvad tõepoolest endomeetriumi rakkude sisemusse (joonis 13.A.). Veendumaks, et rakkudesse liigub terve vesiikul, mitte aga ei toimu vesiikuli ja raku plasmamembraani ühinemist, kasutati mikrovesiikulite membraani märgistamiseks lipiidivärvi. Joonisel 13.B. on näha, et kogu punane märgis, mis tähistab

mikrovesiikuli membraani, on liikunud rakku sisse ega ole nähtav osana plasmamembraanist. Kontrollkatse teostati madalal temperatuuril (4°C), mille juures peaks lakkama rakkude endotsütoosi võime. Joonisel 13.C. on näha, et madalal temperatuuril on mõned mikrovesiikulid seondunud rakkude plasmamembraani välispinnale.



Joonis 13. Trofoblasti rakkudest pärit märgistatud mikrovesiikulite sisenemine endomeetriumi rakkudesse. Endomeetriumi rakke eksponeeriti mikrovesiikulitega järgmiselt: **A** – mikrovesiikulid, millel märgistati integriin $\beta 4$ subühik, 37°C. **B** – lipiidivärviga FM 1-43 märgistatud mikrovesiikulid, 37°C. **C** - lipiidivärviga FM 1-43 märgistatud mikrovesiikulid, 4°C. Numbritega on tähistatud trofoblasti rakuliinid, mille kasvukeskkonnast mikrovesiikulid eraldati: 1 - JAR rakuliin, 2 - JEG-3 rakuliin. Kujutised on saadud konfokaalmikroskoobi abil ning töödeldud programmiga Imaris. Kollane tähistab raku piirjooni, sinine (Hoechst värv) raku tuumasid ning punane mikrovesiikuleid.

2.4. Arutelu

2.4.1. Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite eraldamine ja iseloomustamine

Käesoleva magistritöö põhiliseks eesmärgiks oli analüüsida trofoblasti rakuliinide poolt sekreteeritud mikrovesiikulite valgulist koostist ning otsida nende tuvastamiseks sobiv markervalk. Lisaks sellele uuriti trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite ja endomeetriumi rakkude koostoimet. Töö esimeses osas keskenduti mikrovesiikulite eraldamisele trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 kasvukeskkonnast. Kuivõrd on teada, et trofoblasti rakud võivad eraldada ümbritsevasse keskkonda mitmeid eri tüüpi vesiikuleid (eksosoomide, mikrovesiikuleid, apoptootilisi kehi), siis tuli kõigepealt eraldada mikrovesiikulid ülejäänud mikroosakestest. Üldjuhul eraldatakse mikrovesiikulid apoptootilistest kehade ja eksosoomidest erinevate tsentrifuugimiste ja ultratsentrifuugimiste abil (Théry jt., 2001). Siiski vajab see meetod täiendavat kontrolli, selleks et välistada eksosoomide esinemist sadestatud mikrovesiikulite populatsioonis (Van der Pol jt., 2010). Üheks lihtsamaks kriteeriumiks, mille järgi eksosoomide ja mikrovesiikuleid eristada on nende suurus. Eksosoomid on enam-vähem ühesuguse suurusega (40-100 nm) ja üldjuhul väiksemad kui mikrovesiikulid (100-1000 nm) (György jt., 2011). Käesoleva töö ettevalmistavas osas mõõdeti JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud ning 10 000×g või 100 000×g juures sadestatud vesiikulite keskmised suurused (joonis 7). Veenduti, et 10 000×g juures sadestatud mikrovesiikulite keskmine diameeter jäi oodatavasse vahemikku (100-1000 nm), näidates selgelt, et see mikrovesiikulite populatsioon eksosoomide (diameeter <100 nm) ei sisalda. Samuti ei tuvastatud mikrovesiikulite populatsioonis tunduvalt suuremaid vesiikuleid kui 1 µm, mis kinnitab apoptootiliste kehade puudumist. 100 000×g juures sadestatud vesiikulite, milleks ilmselt oli eksosoomide ja mikrovesiikulite segu, suurus varieerus tunduvalt enam kui võis oodata. Kuigi vesiikuleid filtreeriti (filtri poori suurus 0,22 µm) enne 100 000×g juures sadestamist, selleks et eemaldada suuremaid osakesi, näitas analüüs, et sademes oli ka suuremaid vesiikuleid kui 200 nm. On võimalik, et peale vesiikulite segu filtreerimist osa eksosoomide siiski agregeerusid omavahel, kas siis 100 000×g juures sadestades või -80°C hoiustades. Siiski näitasid tulemused, et 100 000×g juures sadestatud materjalis sisalduvad ka 30-100 nm suurused eksosoomid.

Selleks, et eristada trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikuleid eksosoomidest ja neid vesiikulite segust tuvastada, võeti eesmärgiks leida markervalk, mis ekspresseeruks

enamike trofoblasti mikrovesiikulite pinnal. Esmalt vaadeldi trofoblasti rakkudele iseloomuliku membraanivalgu, tsütokeratiin-7 (Maldonado-Estrada jt., 2004) ekspressiooni 10 000×g juures sadestatud mikrovesiikulitel. Selgus, et seda valku mikrovesiikulite pinnal siiski ei ole (tulemused ei ole esitatud). Seejärel püüti mikrovesiikulitel tuvastada valke, mis pole küll trofoblastile ainuomased, kuid on rikkalikult esindatud erinevate rakutüüpide plasmamembraanis. Sellisteks valkudeks osutusid integriinid, millel on ülimalt oluline roll trofoblasti migreerumisel detsiiduasse. Valik integriinide $\alpha 5\beta 1$ ja $\alpha 6\beta 4$ vahel kaldus $\alpha 6\beta 4$ kasuks kahel põhjusel. Esiteks on JAR rakuliin oma morfoloogia poolest sarnane villoosse trofoblasti rakkudele (Apps jt., 2009), mis ekspresseerivad rohkesti $\alpha 6\beta 4$ integriini ning teiseks, kuigi JEG-3 rakuliini peetakse pigem ekstravilloosseks trofoblasti liiniks, siis samas on näiteid tema mosaiiksest morfoloogiast (Lash jt., 2007), vähesest invasiivsusest (Ng jt., 2012) ning integriin $\alpha 6$ ahela ekspressioonist (Godbole jt., 2011), mis kõik viitavad integriin $\alpha 6\beta 4$ esinemisele. JAR ja JEG-3 rakkudel vaadeldi integriini $\alpha 6\beta 4$ ahelaid eraldi ning leiti et mõlema rakuliini puhul kannavad üle poolte rakkudest vähemalt üht integriini ahelat. Siiani on näidatud, et integriini $\beta 4$ ahel on seotud ainult $\alpha 6$ ahelaga (Barczyk jt., 2010) ning vaid heterodimeerne integriin on täielikult funktsionaalne (Merdek jt., 2007). Võib arvata, et integriin $\alpha 6$ sisaldavate rakkude väiksem hulk rakupopulatsioonis võib olla tingitud vastava antikeha madalamast afiinsusest võrreldes $\beta 4$ ahela vastase antikehaga, andes erineva positiivsete rakkude hulga. Vaadeldes samade integriini ahelate esinemist mikrovesiikulite pinnal, tuvastati integriini $\beta 4$ ahela olemasolu veidi üle poolte mikrovesiikulitest, mistõttu edasistes katsetes kasutati trofoblasti rakkude markervalguna integriini $\beta 4$ ahelat. *Western blot* analüüsi abil kontrolliti kõnealuste integriini ahelate olemasolu JAR ja JEG-3 rakkude ja mikrovesiikulite lüsaadis. ning leiti, et nii integriini $\alpha 6$ kui $\beta 4$ ahel on mõlemas rakulüsaadis olemas. Seevastu integriini $\alpha 6$ ahelat mikrovesiikulite lüsaadis ei tuvastatud. Võib oletada, et põhjuseks on antikeha madal afiinsus ja materjali vähesus. Integriini $\beta 4$ ahel on küll mikrovesiikulite lüsaadis tuvastatav, kuid vastav valgutriip on laialivalguv ja oodatust madalamal, mis viitab valgu modifitseerimisele mikrovesiikuli moodustumisel. On võimalik, et vesiikuli pungumisel kui toimub tsütoskeleti ümberkorraldamine lõigatakse integriin $\beta 4$ ahela pikast tsütoplasmaatilisest, osast mingi piirkond ära. $\beta 4$ ahel eristubki teistest integriinide β ahelatest just oma pika tsütoplasmaatilise saba poolest, mis osaleb hemidesmosoomi kuuluvate valkude ankurdamises ja üldisemalt epiteeli rakkude terviklikkuse, migratsioonivõime ja ellujäämise tagamises. Integriin $\beta 4$ ahela lõikamist on varem näidatud Ca^{2+} poolt aktiveeritud kaspasid poolt, mis osalevad kas otsesel või gelsoliini vahendusel toimuval aktiini lõikamisel, võimaldades tsütoskeleti ümberkorraldamist ja apoptootiliste kehade moodustumist (Werner jt., 2007). Ca^{2+} ionide poolt käivitav raku

aktiveerimine ja tsütoskeleti ümberkorraldamine on oluline ka mikrovesiikulite tekke protsessis, lubades oletada, et integriin $\beta 4$ ahela lõikamisel võib olla oluline roll trofoblasti mikrovesiikulite moodustumisel. Normaalsest lühema integriin $\beta 4$ ahela puhul võib tekkida probleeme heterodimeeri moodustumisega, mistõttu võibki integriini $\alpha 6$ ahelat olla mikrovesiikulites vähem. Seda, et integriin $\beta 4$ ahela tsütoplasmaatilise osa lühenemise korral ei toimu temale enam $\alpha 6$ ahela seondumist, on eelnevalt näidatud põie epiteeli rakkudes (Spinardi jt., 1995).

Edasiste katsete korrektsuse huvides veenduti, et 10 000×g juures sadestatud vesiikulite fraktsioon ei sisaldaks suures hulgas eksosoomidele iseloomulikke markervalku. Eksosoomide markervalguks valiti tetraspaniin CD63, mis on *Exocarta* andmebaasi põhjal neil üks enim esinev valk (http://exocarta.org/exosome_markers). Kuna on teada, et osadel trofoblasti rakuliinidel CD63 ei ekspresseeru (Atay jt., 2011), siis kontrolliti esmalt selle olemasolu JAR ja JEG-3 rakkudel. Tehti kindlaks, et peaaegu kõik nende rakuliinide rakud kannavad CD63 ning see valk on tuvastatav ka 100 000×g juures sadestatud, eksosoomidega rikastatud, materjalis. Kuivõrd see valk sobis eksosoomide markeriks, siis vaadeldi selle ekspressiooni ka mikrovesiikulites. Saadud tulemused näitasid, et suurem osa 10 000×g juures sadestatud vesiikulitest ei kannu pinnal eksosoomide markervalku ning seega on sadestatud materjalis valdavalt mikrovesiikulid. CD63 esinemine mõnedel vesiikulitel võib olla põhjustatud asjaolust, et nimetatud tetraspaniin võib sattuda vahel ka punguvate mikrovesiikulite membraani koostisse.

2.4.2. Mikrovesiikulite valkude tuvastamine ja nende valgulise koostise analüüs

Atay jt. uurisid 2011. aastal trofoblasti rakuliini Swan71 rakkude kasvukeskkonnast eraldatud eksosoomide proteoomi (Atay jt., 2011), kuid siiani puuduvad tööd trofoblasti mikrovesiikulite valgulise koostise kohta. Seepärast oli selle magistritöö üheks eesmärgiks uurida, millised valgud on pakitud JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulitesse. Leiti, et mõlema rakuliini rakkudest sekreteeritud mikrovesiikulite valgud on üpris sarnased, erinedes mõnekümne valgu osas, millest vaid paar olid tuvastatud rohkem kui viie peptiidi abil. JAR mikrovesiikulitest leitud *Dipeptidyl-peptidase 3* (DPP3) ning JEG-3 mikrovesiikulitest leitud *Drebrin*'i (DBN1) ekspressiooni erinevuste kohta erinevates trofoblasti tüüpides seni informatsiooni ei ole. Seevastu *Tumor-associated calcium signal transducer 2* (TACSTD2 ehk varasema nimega TROP-2) ja *Human leukocyte antigen G* (HLA-G) esinemine ainult JEG-3 rakkudest pärit mikrovesiikulites kinnitas saadud

tulemuste usaldusväärsust. Nimelt on varem näidatud, et TACSTD2 esineb ainult JEG-3 rakkudes (Lipinski jt., 1981) ning JAR ja JEG-3 rakuline eristataksegi just HLA-de erineva ekspressiooni kaudu (Apps jt., 2009). Lisaks eelnevale tehti andmebaasiotsinguga kindlaks, et suurem enamus selles töös JAR ja JEG-3 rakkude vesiikulites tuvastatud valkudest on ka varem trofoblastis ning rakkudest sekreteeritud vesiikulites kirjeldatud. Samuti kinnitasid proteoomika tulemused, et uuritav vesiikulite populatsioon sisaldas põhiliselt mikrovesiikuleid. Nimelt ei tuvastatud mass-spektromeetria abil olulisi eksosoomi markervalke CD63, CD81, ICAM-1, TSG101 (Schorey ja Bhatnagar 2008) ning ka CD9-t leiti vaid vähesel määral ainult JAR mikrovesiikulites. Apoptootiliste kehade markerina kasutatavatest histoonidest leiti vaid histoon H4, mistõttu ei sisalda see vesiikulite populatsioon ka olulisel määral apoptootilisi kehi.

Mass-spektromeetria andmed läbisid bioinformaatilise rikastusanalüüsi, selleks et ennustada, millised võiksid olla trofoblasti mikrovesiikulites kirjeldatud valkude rakusisene paiknemine, nende funktsioonid ja roll bioloogilistes protsessides. Analüüsides valkude paiknemist rakus, olid tulemused ootuspärased. Tuvastatud valkudest enamus pärines kas raku plasmamembraanist või tsütosoolist, olles mikrovesiikulite pungumisel rakust kaasa haaratud. On tõenäoline, et vesiikuli eraldumisele eelneva tsütoskeleti ümberkorraldumise käigus osad valgud satuvad ka sekreteeritavatesse mikrovesiikulitesse, mida kinnitas ka analüüs. Tsütoplasma vesiikulites ja tsütoplasmas olevates membraanidega seotud vesiikulites paiknevate valkude olemasolu trofoblasti mikrovesiikulites võib seletada mikrovesiikulite tekke protsessiga, mille käigus sorditakse teatud molekule punguvatesse mikrovesiikulitesse tsütoplasma vesiikulite abil. Analüüsides mikrovesiikulites asuvate valkude osalemist konkreetsetes bioloogilistes protsessides saadi ootuspärased tulemused. Nimelt selgus, et need valgud võiksid osaleda teiste valkude paiknemise ja transpordi reguleerimises ning ka nendega komplekside moodustamises. Mikrovesiikulitesse pakitud valkude molekulaarsete funktsioonide hindamisel ilmnas, et enamik vesiikulitesse pakitud valkudest osaleb erinevat tüüpi nukleiinhapete ja nende komplekside sidumisel. Näiteks osalevad mitmed valgud nukleotiidide, ribonukleotiidide ja nukleosiidide, aga ka ATP- ning RNA-sidumisel. Selliste valkude olemasolu mikrovesiikulites viitab nende võimalikule osalemisele mRNA või miRNA molekulide transpordis ja ülekandes ühest rakust teise. Praeguseks on veel vähe töid, mis kirjeldaksid mikrovesiikulite rolli nukleiinhapete kandjatena. Rohkem on sellist funktsiooni omistatud väiksematele rakkude poolt sekreteeritud vesiikulitele, eksosoomidele. Siiski võib olukord lähitulevikus muutuda, sest nii mõnedki eksosoomide käsitlevad tööd on

vesiikulite eraldamise metoodika eripära tõttu vaadeldud eksosoomide ja mikrovesiikulite segapopulatsiooni. Näiteks avaldasid Donker jt. 2012. aastal artikli, kus nad uurisid primaarsete trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud eksosoomides paiknenud 19. kromosoomist pärit miRNAde klasteri ekspressiooni. Nende poolt vaadeldud vesiikulite suurus varieerus aga 30-250 nm, hõlmates seega ka väiksemaid mikrovesiikuleid. Kas trofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulid sisaldavad ka mRNAsid ja miRNAsid ja kui, siis milliseid, see nõuab edasist uurimist.

2.4.3. Endomeetriumi rakkude ja trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite koostoime

Embrüo implanteerumine emaka seina ja platsenta moodustumine on keeruline protsess, mis nõuab täpset kontrollmehhanismi ja erinevate rakkude koordineeritud koostööd. Ühe olulise komponendina on sellesse protsessi kaasatud rakkude poolt sekreteeritud vesiikulid. Praeguseks on põhjalikumalt uuritud trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite osa emapoolse immuunvastuse ümberkujunemises (Toth jt., 2007). Rakkude poolt sekreteeritud vesiikulite roll trofoblasti ja endomeetriumi vahelises otseses suhtlemises on aga siiani leidnud vähest tähelepanu. Selles töös uuriti trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite ning endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkude võimalikku koostoimet. Varasemad uuringud on näidanud, et mikrovesiikulite transport ühest rakust teise on reguleeritud protsess, mis toimub osade rakkude vahel eelistatumalt kui teiste vahel (Lösche jt., 2004). Sellest lähtuvalt kasutati kontrollina melanoomi rakuliini C32, millel on trofoblasti rakkudest väga erinev koeline päritolu. Leiti, et füsioloogilisel temperatuuril, so 37°C juures, sisenesid trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid ligikaudu 40% endomeetriumi rakkudesse. Melanoomi C32 rakud seevastu ei võtnud mikrovesiikuleid olulisel määral sisse, viidates seega trofoblasti mikrovesiikulite spetsiifilisele äratundmisele ja eelistatud sissevõtmisele endomeetriumi rakkude poolt. Seega võib oletada, et mikrovesiikulid võivad seonduda oma pinnavalkude kaudu endomeetriumi rakkude vastavatele retseptoritele. Millised need retseptorid on, nõuab aga juba edasist uurimist.

Kui analüüsida rakkude 3D kujutisi selgub, et mikrovesiikulite markervalk integriini $\beta 4$ ahel on liikunud retsipienttraku tsütoplasmasse. Erineva päritoluga vesiikuleid võetakse retsipientrakkudesse sisse erinevate mehhanismide abil. Selleks, et selgitata, milline võiks olla trofoblastidest pärit mikrovesiikulite sissevõtmise mehhanism endomeetriumi rakkudesse, kontrolliti kahte kõige tõenäolisemat võimalust, mikrovesiikulite membraani ja raku

plasmamembraani ühinemist või siis mikrovesiikuli kui terviku endotsütootilist liikumist sihtmärkrakku. Eristamaks neid kahte protsessi kasutati madalat temperatuuri, mis inhibeerib kõik aktiivsed protsessid, kaasa arvatud endotsütoosi, kuid ei mõjuta energiast sõltumatut membraanide ühinemist (Tian jt., 2010). Mikrovesiikulite paiknemise jälgimiseks märgistati nende pind lipiidivärviga ja viidi nad endomeetriumi rakkude kasvukeskkonda. Leiti, et 4°C juures liikus vaid väike osa mikrovesiikulitest rakkude tsütoplasmasse. Kui vaadelda endomeetriumi rakkude 3D kujutisi, siis selgub, et enamikel juhtudel olid vesiikulid seondunud küll raku pinnale, kuid polnud liikunud rakku sisse. Seevastu 37°C juures olid lipiidivärviga märgistatud mikrovesiikulid liikunud rakkude tsütoplasmasse, selle asemel, et märgistamiseks kasutatud värv oleks integreerunud märklaudraku plasmamembraani. Selle põhjal võib oletada, et mikrovesiikulid liiguvad tervikuna endomeetriumi rakkudesse, mitte ei ühine plasmamembraaniga. Millise konkreetse endotsütoosi mehhanismiga on antud juhul tegemist, tuleb edaspidi täpsemalt uurida. Arvestades, et enamiku trofoblastide poolt sekreteeritud vesiikulite keskmine suurus jäi alla 500 nm, mis on piiriks energiast sõltuvatele endotsütoosi radadele (Rejman jt., 2004) ning seda, et sissevõtmine toimus eelistatult endomeetriumi rakkudesse, võib oletada et trofoblasti mikrovesiikuleid võetakse sisse energiast sõltuva retseptorvahendatud protsessi käigus.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli analüüsida trofoblasti rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite valgulist koostist ning leida nende tuvastamiseks sobiv markervalk. Töös uuriti ka trofoblastidest pärit mikrovesiikulite sisenemist endomeetriumi rakkudesse, eesmärgiga välja selgitada, kas need mikrovesiikulid võivad osaleda trofoblasti ja endomeetriumi rakkude omavahelises suhtlemises. Sellest lähtudes käsitletakse kirjanduse ülevaates rakkude poolt ümbritsevasse keskkonda sekreteeritavate vesiikulite biogeneesi, molekulaarset koostist ja funktsioone, kusjuures eriline rõhk on asetatud mikrovesiikulite kirjeldamisele. Ülevaade antakse ka implantatsioonist ning platsenta arengust, kirjeldamaks uuringutes kasutatud rakutüüpide rolli varases raseduses.

Magistritöö eksperimentaalses osas eraldati trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 kasvukeskkonnast mikrovesiikulid ning tuvastati, et nende markervalguks on sobilik mikrovesiikulite membraanis paiknev $\alpha\beta 4$ integriini $\beta 4$ -ahel. Selleks, et eristada trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikuleid samadest rakkudest sekreteeritavatest väiksematest eksosoomidest mõõdeti vesiikulite diameeter. Vesiikulite suurus ja eksosoomide markervalgu CD63 ekspressiooni analüüs mikrovesiikulite preparaadis võimaldas hinnata, millisel määral oli mikrovesiikulite hulgas eksosoomide. Seejärel tehti mikrovesiikulitega rikastatud vesiikulite populatsioonile mass-spektromeetria abil üldine valguanalüüs. Mikrovesiikulites esindatud valkude puhul hinnati nende rakusisest paiknemist, funktsioone ja rolle bioloogilistes protsessides bioinformaatilise rikastusanalüüsi abil. Leiti, et suur osa trofoblasti mikrovesiikulite valkudest pärinevad raku plasmamembraanist, tsütosoolist, tsütoskeletist ja vesikulaarsetest kompartmentidest ning võivad seega osaleda teiste valkude paiknemise ja transpordi reguleerimises. Lisaks sellele võivad need siduda erinevat tüüpi nukleiinhappeid ja nende komplekse, mis viitab nende osale mRNA või miRNA molekulide transpordis ja ülekandes ühest rakust teise.

Lähemalt uuriti võimalust, et trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulid sisenevad endomeetriumi rakkudesse ja osalevad nii nende rakkude omavahelises suhtlemises kui ka embrüo ja platsenta rasedusaegses suhtluses. Leiti, et füsioloogilisel temperatuuril (37°C) sisenes ~40% trofoblasti mikrovesiikulitest endomeetriumi rakkudesse kuid kontrollrakkudesse neid sisse ei võetud. Saadud tulemused viitavad seega trofoblasti mikrovesiikulite spetsiifilisele äratundmisele ja eelistatud sissevõtmisele endomeetriumi

rakkude poolt. Katseliselt määrati kindlaks ka asjaolu, et suure tõenäosusega liiguvad trofoblasti mikrovesiikulid endomeetriumi rakkudesse endotsütoosi teel.

Kokkuvõtteks võib öelda, et trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite valguline koostis ning tõenäoliselt eelistatud sisenemine endomeetriumi rakkudesse endotsütoosi teel lubab arvata, et neil on oluline osa trofoblasti ja endomeetriumi rakkude vahelises suhtluses ning endomeetriumi rakkude füsioloogiliste protsesside kujundamises. Milliseid konkreetseid mRNAsid ja miRNAsid trofoblasti mikrovesiikulid transpordivad, milliste mikrovesiikuli ja endomeetriumi rakkude pinnavalkude vahel tekib side vesiikulite sisenemisel ning millised konkreetsed muutused toimuvad endomeetriumi rakkudes peale vesiikulite sisenemist, jääb edasise uurimise eesmärgiks.

The proteomical analysis of microvesicles derived from trophoblast cell lines JAR and JEG-3 and the characterization of their uptake into endometrial cell line RL95-2

Mariann Koel

SUMMARY

Eukaryotic cells release into their extracellular environment complex structures called membrane vesicles that are thought to play important roles in intercellular communication. These vesicles include exosomes, activation induced microvesicles and apoptotic bodies. It is shown that exosomes or the slightly larger microvesicles are released from the endometrial epithelium into the uterine cavity and may contribute to the endometrium-embryo cross-talk essential for embryo implantation. However, the direct interactions between the endometrial cells and the trophoblast-derived microvesicles have not yet been clearly shown and their functional significance in embryo implantation is still obscure.

Therefore, the aim of the study was to isolate microvesicles derived from trophoblast cell lines, extract and identify all proteins present in these microvesicles and find out if these microvesicles might also participate in trophoblast and endometrial cell cross-talk. First of all we detected that the $\beta 4$ -chain of integrin $\alpha 6\beta 4$ is suitable as the specific marker of trophoblast derived microvesicles. To exclude the smaller exosomes, the size of microvesicles was measured and their surface was screened with exosomes specific marker CD63. The proteomic characterization of trophoblast derived microvesicles was performed by mass-spectrometry and their subcellular localizations, functions and biological processes were determined by bioinformatic enrichment analysis. Most of the trophoblast proteins originate from cell membrane, cytosol, cytoskeleton and vesicular compartments and are involved in protein localisation and transport. These localisations of proteins and processes involved are accordance with the biogenesis of microvesicles. It was also found that many of the proteins identified in microvesicles might be involved in nucleic acids binding and transport. This supports their participation in horizontal transfer of mRNA and miRNA molecules between the distinct endometrial and trophoblast cells.

The possibility that endometrial cells take up specifically the trophoblastic microvesicles was also demonstrated. This phenomenon further supports the idea of those microvesicles being involved in the communication between the trophoblast and endometrial cells during the implantation process. More specifically, we detected that about 40% of trophoblasts were penetrated by microvesicles at physiological temperature, while the control cells did not

interact with the labelled microvesicles. These results indicate that trophoblast microvesicles are specifically identified and preferably entered into the endometrial cells. Thus our results strongly support the opinion that the microvesicles penetrate into the endometrial cells by using the endocytotic processes.

As a conclusion, because of the fact that many of the microvesicular proteins are involved in protein and RNA transfer and these microvesicles are preferably endocytosed into endometrial cells it is very likely that trophoblast-derived microvesicles are important mediators of specific communication between the fetal trophoblast and maternal endometrial cells. However, which of the specific mRNAs and miRNAs are involved and transferred between the cells by the trophoblastic microvesicles remains to be clarified by the future studies.

TÄNUSÕNAD

Ma soovin tänada oma juhendajaid Sulev Ingerpuud ja Andres Salumetsa igakülgse abi ja heade nõuannete eest töö valmimisel.

KASUTATUD KIRJANDUS

Admyre, C., Grunewald, J., Thyberg, J., Gripenbäck, S., Tornling, G., Eklund, A., Scheynius, A. and Gabrielsson, S. (2003). Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *European Respiratory Journal* 22:578–583.

Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Laheesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A. and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology* 179:1969–1978.

Allan, D., Billah, M. M., Finean, J. B. and Michell, R. H. (1976). Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca^{2+}]$. *Nature* 261:58-60

Andre, F., Scharztz, N. E. C., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E. and Zitvogel, L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet* 360:295–305.

Apps, R., Murphy, S. P., Fernando, R., Gardner, L., Ahad, T. and Moffett, A. (2009). Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 127: 26–39.

Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I. M., Skupski, D. and Witkin, S. S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of Reproductive Immunology* 79:12–17.

Atay, S., Gercel-Taylor, C., Kesimer, M. and Taylor, D. D. (2011). Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Experimental Cell Research* 317:1192–1202.

Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. and David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology* 14:677–85.

Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Węglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., Ratajczak, M. and Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 55:808–818.

Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research* 339:269–280.

Barry, O. P., Kazanietz, M. G., Praticò, D. and FitzGerald, G. A. (1999). Arachidonic Acid in Platelet Microparticles Up-regulates Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin Formation via a Protein Kinase C/Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274:7545–7556.

- Basak, S., Dhar, R. and Das, C. (2002). Steroids Modulate the Expression of $\alpha 4$ Integrin in Mouse Blastocysts and Uterus During Implantation. *Biology of Reproduction* 66:1784–1789.
- Bellingham, S. A., Guo, B., Coleman, B. and Hill, A. F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in Physiology* 3:124.
- Bellone, M., Iezzi, G., Rovere, P., Galati, G., Ronchetti, A., Protti, M. P., Davoust, J., Rugarli, C. and Manfredi, A. A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *The Journal of Immunology* 159:5391–5399.
- Berda-Haddad, Y., Robert, S., Salers, P., Zekraoui, L., Farnarier, C., Dinarello, C. A., Dignat-George, F. and Kaplanski, G. (2011). Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:20684–20689.
- Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M. J., Spetz, A.-L. and Holmgren, L. (2001). Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:6407–6411.
- Bettache, N., Gaffet, P., Allegre, N., Maurin, L., Toti, F., Freyssinet, J. M. and Bienvenüe, A. (1998). Impaired redistribution of aminophospholipids with distinctive cell shape change during Ca²⁺-induced activation of platelets from a patient with Scott syndrome. *British Journal of Haematology* 101:50–58.
- De Broe, M. E., Wieme, R. J., Logghe, G. N. and Roels, F. (1977). Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clinica Chimica Acta* 81:237–245.
- Burrows, T. D., King, A. and Loke, Y. W. (1996). Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update* 2:307–321.
- Caby, M., Lankar, D., Vincendeau-scherrer, C. and Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology* 17:879–887.
- Chargraff, E. and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of biological chemistry* 166:189-97.
- Cocca, B. A., Cline, A. M. and Radic, M. Z. (2002). Blebs and Apoptotic Bodies Are B Cell Autoantigens. *The Journal of Immunology* 169:159–166.
- Cocucci, E., Racchetti, G. and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology* 19:43–51.
- Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P. and Meldolesi, J. (2007). Enlargeosome Traffic: Exocytosis Triggered by Various Signals Is Followed by Endocytosis, Membrane Shedding or Both. *Traffic* 8:742–757.

Comfurius, P., Williamson, P., Smeets, E. F., Schlegel, R. A., Bevers, E. M. and Zwaal, R. F. A. (1996). Reconstitution of Phospholipid Scramblase Activity from Human Blood Platelets. *Biochemistry* 35:7631–7634.

Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. and López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 106:1604–1611.

Connor, J., Pak, C. H., Zwaal, R. F. and Schroit, A. J. (1992). Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *Journal of Biological Chemistry* 267: 19412–19417.

Cotter, T. G., Lennon, S. V, Glynn, J. M. and Green, D. R. (1992). Microfilament-disrupting Agents Prevent the Formation of Apoptotic Bodies in Tumor Cells Undergoing Apoptosis. *Cancer Research* 52:997–1005.

Crespin, M., Vidal, C., Picard, F., Lacombe, C. and Fontenay, M. (2009). Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 20: 63–70.

Damsky, C. H., Librach, C., Lim, K. H., Fitzgerald, M. L., McMaster, M. T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S. K. and Fisher, S. J. (1994). Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120:3657–3666.

Deregibus, M. C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B. and Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110:2440–2448.

Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. A., Stolz, D. B., Morelli, A. E. and Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular human reproduction* 18:417–24.

Eken, C., Gasser, O., Zenhausern, G., Oehri, I., Hess, C. and Schifferli, J. A. (2008). Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 180:817–824.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* 148:2207–2216.

Faille, D., El-Assaad, F., Mitchell, A. J., Alessi, M.-C., Chimini, G., Fusai, T., Grau, G. E. and Combes, V. (2012). Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16:1731–1738.

- Fox, J. E., Austin, C. D., Boyles, J. K. and Steffen, P. K. (1990). Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* 111:483–493.
- Frost, J. M. and Moore, G. E. (2010). The Importance of Imprinting in the Human Placenta. *PLoS Genet* 6:e1001015.
- Fujiwara, H. (2006). Immune cells contribute to systemic cross-talk between the embryo and mother during early pregnancy in cooperation with the endocrine system. *Reproductive Medicine and Biology* 5:19–29.
- De Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G. and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102:4336–4344.
- Gasser, O. and Schifferli, J. A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 104:2543–2548.
- Germain, S. J., Sacks, G. P., Soorana, S. R., Sargent, I. L. and Redman, C. W. (2007). Systemic Inflammatory Priming in Normal Pregnancy and Preeclampsia: The Role of Circulating Syncytiotrophoblast Microparticles. *The Journal of Immunology* 178: 5949–5956.
- Giusti, I., D’Ascenzo, S. and Dolo, V. (2013). Microvesicles as Potential Ovarian Cancer Biomarkers. *BioMed Research International* 2013:1-12.
- Godbole, G., Suman, P., Gupta, S. K. and Modi, D. (2011). Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. *Fertility and Sterility* 95:1278–1283.
- György, B., Módos, K., Pállinger, É., Pálóczi, K., Pásztói, M., Misják, P., Deli, M. A., Sipos, Á., Szalai, A., Voszka, I., Polgár, A., Tóth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, Á. and Buzás, E. I. (2011). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117:39–48.
- György, B., Szabó, T., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A. and Buzás, E. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:2667–2688.
- Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology* 97:329–339.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavölgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I. and Falk, K. I. (1999). Horizontal Transfer of DNA by the Uptake of Apoptotic Bodies. *Blood* 93:3956–3963.

- Hristov, M., Erl, W., Linder, S. and Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 104:2761–2766.
- Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C. and Freyssinet, J.-M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda, Md.)* 20: 22–7.
- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reca, R., Turner, A. R., Ratajczak, J., Emerson, S. G., Kowalska, M. A. and Ratajczak, M. Z. (2001). Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 98:3143–3149.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239–257.
- Knight, M., Redman, C. W. G., Linton, E. A. and Sargent, I. L. (1998). Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 105:632–640.
- Lash, G. E., Hornbuckle, J., Brunt, A., Kirkley, M., Searle, R. F., Robson, S. C. and Bulmer, J. N. (2007). Effect of Low Oxygen Concentrations on Trophoblast-Like Cell Line Invasion. *Placenta* 28:390–398.
- Lee, T. L., Lin, Y. C., Mochitate, K. and Grinnell, F. (1993). Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta 1 integrin receptors. *Journal of Cell Science* 105:167–177.
- Lipinski, M., Parks, D. R., Rouse, R. V. and Herzenberg, L. A. (1981). Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:5147–5150.
- Lösche, W., Scholz, T., Temmler, U., Oberle, V. and Claus, R. A. (2004). Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets* 15:109–115.
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A. and Surprenant, A. (2001). Rapid Secretion of Interleukin-1 β by Microvesicle Shedding. *Immunity* 15:825–835.
- Macklon, N. S., Geraedts, J. P. M. and Fauser, B. C. J. M. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the ‘black box’ of early pregnancy loss. *Human Reproduction Update* 8:333–343.
- Malassiné, A., and Cronier, L. (2002). Hormones and human trophoblast differentiation. *Endocrine* 19:3–11.

- Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roques, P., Barré-Sinoussi, F. and Chaouat, G. (2004). Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 286:21–34.
- McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H.-G. and Weeds, A. G. (1993). Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364:685–692.
- Merdek, K. D., Yang, X., Taglienti, C. A., Shaw, L. M. and Mercurio, A. M. (2007). Intrinsic Signaling Functions of the $\beta 4$ Integrin Intracellular Domain. *Journal of Biological Chemistry* 282:30322–30330.
- Messerli, M., May, K., Hansson, S. R., Schneider, H., Holzgreve, W., Hahn, S. and Rusterholz, C. (2010). Feto-maternal interactions in pregnancies: Placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta* 31:106–112.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J. and Pittman, R. N. (1998). Apoptotic Membrane Blebbing Is Regulated by Myosin Light Chain Phosphorylation. *The Journal of Cell Biology* 140:627–636.
- Miyazaki, Y., Nomura, S., Miyake, T., Kagawa, H., Kitada, C., Taniguchi, H., Komiyama, Y., Fujimura, Y., Ikeda, Y. and Fukuhara, S. (1996). High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 88:3456–3464.
- Moskovich, O. and Fishelson, Z. (2007). Live Cell Imaging of Outward and Inward Vesiculation Induced by the Complement C5b-9 Complex. *Journal of Biological Chemistry* 282:29977–29986.
- Ng, Y. H., Rome, S., Jalabert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C. L. and Salamonsen, L. A. (2013). Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. *PLoS ONE* 8:e58502.
- Ng, Y. H., Zhu, H. and Leung, P. C. K. (2012). Twist Modulates Human Trophoblastic Cell Invasion via Regulation of N-Cadherin. *Endocrinology* 153:925–936.
- Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gitahi, S. K., Gehr, P. and Nicod, L. P. (2006). Exovesicles from Human Activated Dendritic Cells Fuse with Resting Dendritic Cells, Allowing Them to Present Alloantigens. *The American Journal of Pathology* 169:2127–2136.
- Orlando, K. A., Stone, N. L. and Pittman, R. N. (2006). Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental Cell Research* 312:5–15.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F. and Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13368–13373.

- Pluskota, E., Woody, N. M., Szpak, D., Ballantyne, C. M., Soloviev, D. A., Simon, D. I. and Plow, E. F. (2008). Expression, activation, and function of integrin $\alpha\text{M}\beta 2$ (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 112:2327–2335.
- Van der Pol, E., Hoekstra, A., Sturk, A., Otto, C., Van Leeuwen, T. and Nieuwland, R. (2010). Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8:2596–2607.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine* 183:1161–1172.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P. and Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors : evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia official journal of the Leukemia Society of America Leukemia Research Fund UK* 20:847–856.
- Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S. and Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical Pharmacology* 81:1171–1182.
- Reddy, A., Zhong, X. Y., Rusterholz, C., Hahn, S., Holzgreve, W., Redman, C. W. G. and Sargent, I. L. (2008). The Effect of Labour and Placental Separation on the Shedding of Syncytiotrophoblast Microparticles, Cell-free DNA and mRNA in Normal Pregnancy and Pre-eclampsia. *Placenta* 29:942–949.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* 377:159–169.
- Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J. and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 181:1857–1862.
- Sarani, S. A., Ghaffari-Novin, M., Warren, M. A., Dockery, P. and Cooke, I. D. (1999). Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. *Human Reproduction* 14:3101–3106.
- Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N. and Haslett, C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343:170–173.
- Schorey, J. S. and Bhatnagar, S. (2008). Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* 9:871–881.
- Seigneuret, M. and Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:3751–3755.

- Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T. and Rosania, G. R. (2003). Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells: Association with Gene Expression and Chemosensitivity Profiles. *Cancer Research* 63:4331–4337.
- Shet, A. S., Aras, O., Gupta, K., Hass, M. J., Rausch, D. J., Saba, N., Koopmeiners, L., Key, N. S. and Hebbel, R. P. (2003). Sick blood contains tissue factor–positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102:2678–2683.
- Sibai, B., Dekker, G. and Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *The Lancet* 365:785–799.
- Sidhu, S. S., Mengistab, A. T., Tauscher, A. N., Lavail, J. and Basbaum, C. (2004). The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor – stromal interactions. *Oncogene* 23:956–963.
- Siekevitz, P. (1972). Biological Membranes: The Dynamics of their Organization. *Annual Review of Physiology* 34:117–140.
- Simpson, R. J., Jensen, S. S. and Lim, J. W. E. (2008). Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* 8:4083–4099.
- Sims, P. J., Faioni, E. M., Wiedmer, T. and Shattil, S. J. (1988). Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 263:18205–18212.
- Van Sinderen, M., Menkhorst, E., Winship, A., Cuman, C. and Dimitriadis, E. (2013). Preimplantation Human Blastocyst-Endometrial Interactions: The Role of Inflammatory Mediators. *American Journal of Reproductive Immunology* 69:427–440.
- Singh, M., Chaudhry, P. and Asselin, E. (2011). Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *Journal of Endocrinology* 210:5–14.
- Skriner, K., Adolph, K., Jungblut, P. R. and Burmester, G. R. (2006). Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis & Rheumatism* 54:3809–3814.
- Smalley, D. M., Sheman, N. E., Nelson, K. and Theodorescu, D. (2008). Isolation and Identification of Potential Urinary Microparticle Biomarkers of Bladder Cancer. *Journal of Proteome Research* 7:2088–2096.
- Spinardi, L., Einheber, S., Cullen, T., Milner, T. A and Giancotti, F. G. (1995). A recombinant tail-less integrin beta 4 subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress alpha 6 beta 4-mediated cell adhesion to laminins. *The Journal of Cell Biology* 129:473–487.
- Stein, J. M. and Luzio, J. P. (1991). Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack human neutrophils The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J* 274:381–386.

Zhou, Y., Damsky, C. H., Chiu, K., Roberts, J. M. and Fisher, S. J. (1993). Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *The Journal of Clinical Investigation* 91:950–960.

Taylor, D. D., Akyol, S. and Gercel-Taylor, C. (2006). Pregnancy-Associated Exosomes and Their Modulation of T Cell Signaling. *The Journal of Immunology* 176:1534–1542.

Taylor, D. D., Homesley, H. D. and Doellgast, G. J. (1980). Binding of Specific Peroxidase-labeled Antibody to Placental-type Phosphatase on Tumor-derived Membrane Fragments Binding of Specific Peroxidase-labeled Antibody to Placental-type Phosphatase on Tumor-derived Membrane Fragments1. *Cancer research* 40:4064–4069.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2001). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* 30:3.22.1–3.22.29.

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology* 166:7309–7318.

Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. and Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of Cellular Biochemistry* 111:488–496.

Toth, B., Lok, C. A. R., Böing, A., Diamant, M., Van Der Post, J. A. M., Friese, K. and Nieuwland, Rienk. (2007). Microparticles and Exosomes: Impact on Normal and Complicated Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 58:389–402.

Turiák, L., Misják, P., Szabó, T. G., Aradi, B., Pálóczi, K., Ozohanics, O., Drahos, L., Kittel, Á., Falus, A., Buzás, E. I. and Vékey, K. (2011). Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB / c mice. *Journal of Proteomics* 74:2025–2033.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. and Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9:654–9.

VanWijk, M. J., Svedas, E., Boer, K., Nieuwland, R., VanBavel, E. and Kublickiene, K. R. (2002). Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187:1686–1693.

Werner, M. E., Chen, F., Moyano, J. V., Yehiely, F., Jones, J. C. R. and Cryns, V. L. (2007). Caspase Proteolysis of the Integrin $\beta 4$ Subunit Disrupts Hemidesmosome Assembly, Promotes Apoptosis, and Inhibits Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry* 282:5560–5569.

Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* 13:269–288.

- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R. and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350–351.
- Wollert, T. and Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464:864–869.
- Wysoczynski, M. and Ratajczak, Mariusz Z. (2009). Lung cancer secreted microvesicles: Underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *International Journal of Cancer* 125:1595–1603.
- Xu, G., Guimond, M.-J., Chakraborty, C. and Lala, P. K. (2002). Control of Proliferation, Migration, and Invasiveness of Human Extravillous Trophoblast by Decorin, a Decidual Product. *Biology of Reproduction* 67:681–689.
- Yuan, A., Farber, E. L., Rapoport, A. L., Tejada, D., Deniskin, R., Akhmedov, N. B. and Farber, D. B. (2009). Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PloS one* 4:1–8.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

http://exocarta.org/exosome_markers

<http://www.microvesicles.org/>

<http://www.proteinatlas.org/>

LISAD

Lisa 1. JAR ja JEG-3 rakuliinide mikrovesiikulites tuvastatud valgud. Tabelisse on märgitud mass-spektromeetriliselt vähemalt 5 peptiidi abil tuvastatud valkudele vastavad geeninimed. Numbrid tähistavad, mitme peptiidi abil on vastav valk tuvastatud. MV – mikrovesiikulid.

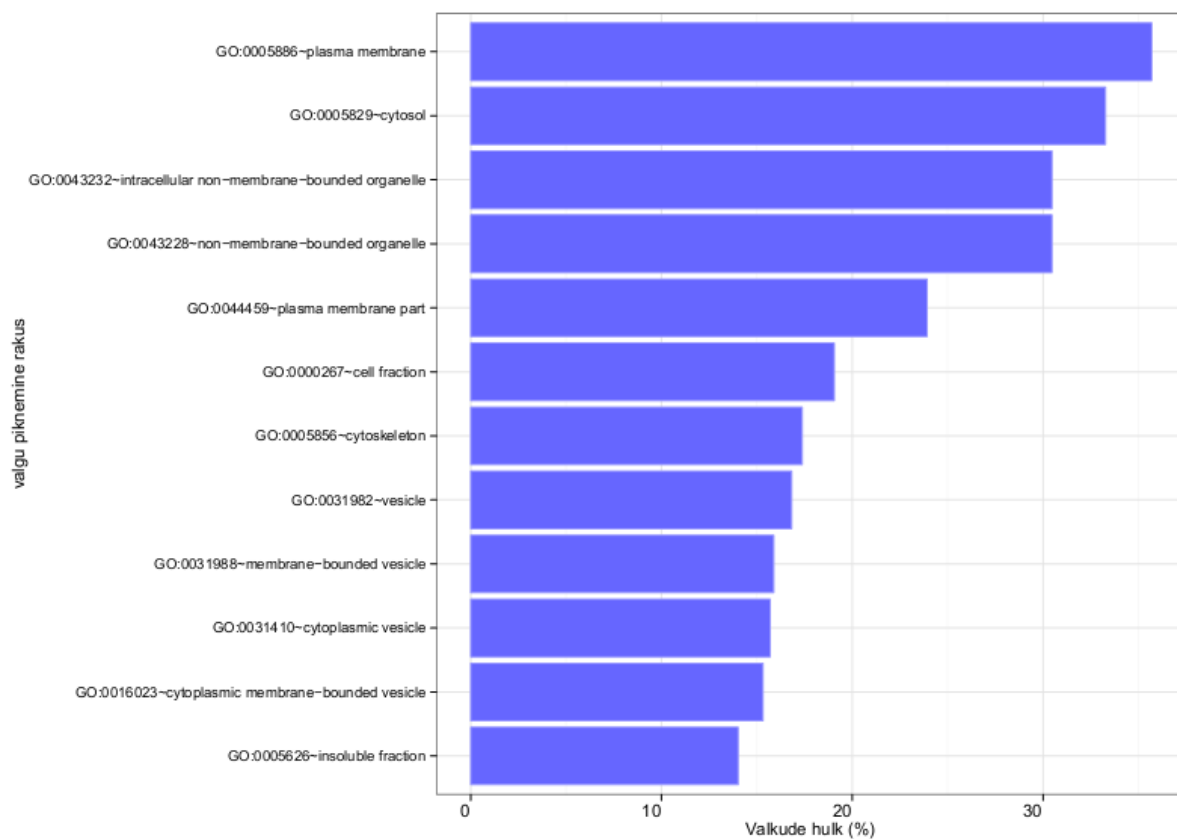
Geeni nimed	JAR MV	JEG MV	Geeni nimed	JAR MV	JEG MV	Geeni nimed	JAR MV	JEG MV
AARS	24	16	ATP1A1	40	40	CDH1	10	11
ABCC1	8	6	ATP1B3	12	12	CHMP4B	7	5
ABCG2	13	12	ATP2A2;ATP2A1	14	11	CHP	9	8
ACLY	20	19	ATP2B4	24	25	CKMT1A;CKMT1B	4	3
ACO1;IRP1	5	4	ATP5A1	20	19	CLDN6	4	5
ACO2	6	6	ATP5B	17	14	CLIC1	8	8
ACOX1	5	6	ATP5C1	5	4	CLIC3	10	9
ACSL4	7	1	ATP5O	5	5	CLIC4	7	6
ACTN1	29	26	ATP6V0A1	7	6	CLTA	5	4
ACTN4	34	33	ATP6V0D1	5	5	CLTC	62	63
ACTR1A	6	6	ATP6V1A	17	18	CNDP2	15	8
ACTR2	7	5	ATP6V1B1	7	7	CNP	6	5
ACTR3	11	9	ATP6V1B2	8	8	COLEC12	6	5
ADK	5	3	ATP6V1E1	8	7	COPA	12	7
AGRN	8	7	ATP6VIH	7	7	CORO1B	5	4
AHCY	12	12	BASP1	15	16	CORO1C	8	7
AHCYL1;AHCYL2	5	5	BCAP31	11	6	COTL1	4	5
AHNAK	140	145	BSG	8	9	CPNE1	5	5
AKAP12	11	14	C22orf28	6	4	CSE1L	15	14
AKR1B1	8	7	C2orf72	5	4	CSF2RA	5	5
ALDH16A1	5	4	CACYBP	8	7	CSNK2A1	6	6
ALDH7A1	5	5	CAD	11	10	CSTA	6	5
ALDOA	17	14	CALD1	7	10	CTNNA1	35	33
ALPPL2	5	4	CALM2;CALM1	9	9	CTNNB1	24	22
ANO6	12	10	CALML5	5	5	CTNND1	28	29
ANXA1	12	13	CALR	15	14	CTPS	10	7
ANXA11	6	7	CAND1	29	19	CTTN	6	6
ANXA2;ANXA2P2	12	12	CANX	29	26	CYB5R3	6	4
ANXA5	18	19	CAP1	12	11	DARS;DKFZp781B11202	11	9
ANXA6	23	23	CAPN1	8	2	DBN1	0	5
ANXA7	6	5	CAPN6	16	16	DDOST	11	11
AP2A1	15	12	CAPZA1	7	7	DDX3X;DDX3Y	13	11
AP2B1	11	10	CAPZB	9	8	DERA	5	3
AP2M1	5	6	CCDC47	6	3	DHX9	20	22
APMAP;C20orf3	7	1	CCT2	24	22	DIAPH1	6	2
APOB	8	8	CCT3	16	12	DLG1	15	15
APOE	11	11	CCT4	16	14	DNAJA1	8	7
APRT	5	4	CCT5	23	20	DNM2	18	17
ARF3;ARF1	5	4	CCT6A	15	14	DOCK9	7	3
ARHGEF2	10	6	CCT7	16	15	DPP3	5	0
ARPC1B	6	6	CCT8	26	24	DPP4	5	6
ARPC2	12	12	CD276	6	5	DSG1	6	6
ARPC4;ARPC4-TLL3	5	5	CD2AP	5	3	DSG2	9	5
ATIC	16	16	CD47	5	5	DSP	54	47
ATP11A	6	6	CD9	5	3	DYNC1H1	62	52
ATP11C	16	16	CDC42	7	7	EEF1A1;EEF1A1P5	20	19

Geeni nimer	JAR MV	JEG MV	Geeni nimer	JAR MV	JEG MV	Geeni nimer	JAR MV	JEG MV
EEF1B2	5	4	GPI	7	6	LAMB1	11	11
EEF1D	10	7	GRB2	6	4	LAMC1	6	4
EEF1E1	5	4	GSTP1	10	9	LAMP1	6	5
EEF1G	14	12	HBB;HBD	2	7	LAMP2	5	5
EEF2	31	24	HIST1H4A	9	10	LARS;PIG44	20	20
EFR3A	9	10	HLA-G;HLA-G2.2	0	6	LASP1	9	8
EGFR	22	19	HNRNPA1;HNRNPA1 L2	9	10	LCP1	24	20
EHD4	8	7	HNRNPA2B1	6	6	LDHA	13	13
EIF3A	14	10	HNRNPC;HNRNPCL 1	7	8	LDHB	13	12
EIF3B	7	5	HNRNPF	5	3	LIMA1	11	9
EIF3EIP;EIF3L	6	6	HNRNPK	15	16	LIN7C;LIN7A	7	6
EIF4A1;EIF4A2	13	13	HNRNPL	5	6	LMAN1	7	3
EIF4G1	10	8	HNRNPM	9	12	LMNB1	5	4
EIF5A;EIF5A2	5	5	HNRNPR	5	4	LPCAT1	6	5
ENG	7	7	HNRNPU	11	11	LRP1	6	12
ENO1	20	20	HPRT1	5	5	LRP2	7	9
EPB41L2;DKFZp781H1 755	12	13	HSD17B4	14	12	LRPAP1	9	9
EPB41L3	12	9	HSP90AA1	24	20	LRPPRC	22	18
EPCAM	5	6	HSP90AB1	17	16	LRRC1	8	9
EPRS	15	14	HSP90B1	32	30	LRRC8A	5	3
ERLIN1	6	6	HSPA1B;HSPA1A	7	7	LRRFIP1	7	4
ERLIN2	8	6	HSPA4	10	5	LYN	10	9
ERP29	5	4	HSPA5	31	32	MAPRE1	7	4
ESYT1	6	5	HSPA8	22	21	MARS	8	8
ESYT2	5	5	HSPA9	25	21	MATR3	5	8
EZR	28	23	HSPD1	27	26	MDH1	8	8
ETF1	5	3	HSPE1	5	4	MDH2	9	8
F11R	9	10	HSPG2	17	3	MLLT4	10	9
FAM129B	17	14	HSPH1	15	9	MME	6	17
FARSB	5	3	HYOU1	25	20	MMP14	11	11
FASN	81	79	IARS	13	13	MPP1	8	7
FERMT2	7	5	IDE	5	3	MPP7	16	14
FKBP4	15	12	IDH2	5	5	MPZL1	5	5
FLNA	59	59	IGF2BP1	6	6	MTHFD1	18	16
FLOT1	9	7	IGF2BP3	8	8	MVP	20	21
FLOT2	12	12	IGSF3	17	15	MYH10	56	53
FN1	14	18	IMPDH2	11	7	MYH9	68	67
FSCN1	15	15	INF2	7	7	MYL12B;MYL12A	9	7
G6PD	7	3	IPO5	7	7	MYL6	5	5
GANAB	21	19	IPO7	5	3	MYO1C	22	22
GAPDH	19	18	IQGAP1	72	69	MYO1E	5	4
GARS	11	9	ISYNA1	7	7	MYO6	8	5
GART	10	9	ITGA1	7	1	MYOF	66	60
GCN1L1	14	9	ITGA5	16	17	NAGK	6	4
GDI2	11	11	ITGAV	21	22	NAPA	5	5
GLO1	6	4	ITGB1	16	17	NARS	8	4
GNA11	9	9	ITGB4	45	46	NASP	4	5
GNA13	12	10	ITGB5	6	6	NCKAP1	12	12
GNAI1	5	5	JUP	16	15	NCL	15	16
GNAI3	6	6	KARS	6	5	NCSTN	6	5
GNAQ	10	9	KIF5B;KIF5A;KIF5C	6	5	NLRP2	21	21
GNAS	15	15	KPNB1	11	9	NOMO2;NOMO3;NOM O1	8	5
GNB2L1	9	9	KRT18	17	19	NPEPPS	18	15
GOT1	11	5	LAMA5	6	3	NPM1	9	8

Geeni nimer	JAR MV	JEG MV	Geeni nimer	JAR MV	JEG MV	Geeni nimer	JAR MV	JEG MV
NPTN;DKFZp566H192 4	5	4	PRKCSH	6	5	RPL26;RPL26L1	7	7
NSDHL	7	5	PRKDC	14	12	RPL28	3	5
NSF	16	13	PRPF8	8	10	RPL3	14	13
NUDC	6	2	PSMA1	6	4	RPL35A	7	7
NUP210	6	2	PSMA2	5	4	RPL4	12	10
ODZ3	4	9	PSMA3	4	4	RPL6	11	10
OLA1	9	7	PSMA6	5	5	RPL7	10	9
OSTF1	6	6	PSMA7;PSMA8	5	5	RPL7A	8	7
P4HB	23	23	PSMB1	5	5	RPL8	6	6
PA2G4	12	9	PSMB5	5	5	RPL9	6	6
PABPC1;PABPC3	6	6	PSMC1	7	5	RPLP0;RPLP0P6	8	8
PACSIN2	5	2	PSMC2	12	9	RPLP2	5	4
PACSIN3	7	3	PSMC3	7	7	RPN1	27	24
PAICS	12	12	PSMC5	7	6	RPN2	13	12
PALM3	9	9	PSMC6	5	5	RPS10	5	3
PARK7	5	4	PSMD1	5	3	RPS11	6	5
PCNA	7	7	PSMD11	13	12	RPS13	4	3
PDCD6	6	6	PSMD12	7	6	RPS14	5	5
PDCD6IP	28	25	PSMD13	5	3	RPS16	9	9
PDIA3	18	17	PSMD14	3	1	RPS18	9	8
PDIA4	25	23	PSMD2	19	16	RPS19	7	4
PDIA6	14	14	PSMD3	10	8	RPS2	9	9
PEBP1	7	6	PSMD6	6	5	RPS3	18	15
PFKL	10	9	PTBP1	5	4	RPS3A	8	8
PFKP	12	12	PTPRF	10	8	RPS4X;RPS4Y1;RPS4Y 2	13	12
PFN1	7	7	PYGL	10	11	RPS6	6	5
PGAM1;PGAM2	12	9	QARS	9	8	RPS7	9	7
PGD	8	7	RAB10	8	8	RPS8	5	5
PGK1	15	14	RAB11B;RAB11 A	10	11	RPS9	13	11
PGM1	10	9	RAB14	14	14	RPSA	7	7
PHB	8	5	RAB1A	7	6	RRAS2	6	6
PHB2	7	4	RAB2A;RAB2B	9	8	RRM1	6	6
PHGDH	13	12	RAB5C	6	6	RUVBL1	10	10
PI4KA	20	17	RAB6A;RAB6B	6	6	RUVBL2	5	5
PICALM	6	5	RAB7A	12	11	S100A16	5	4
PKM2	27	24	RAB8A	5	4	SARS	10	9
PKP2	13	2	RAD23B	7	5	SCARB2	6	5
PLEC	12	6	RALA	6	6	SCRIB	10	9
PLS1	8	1	RAN	10	10	SEPT11	6	5
PLS3	20	19	RARS	17	17	SEPT2	8	8
PLXNA2	5	4	RBBP4;RBBP7	4	3	SEPT7	13	11
PLXNB2	15	14	RCN1	7	7	SEPT9	12	9
PLXND1	11	8	RCN2	5	5	SERBP1	5	4
POR	9	8	RDX	18	13	SERPINB9	8	7
PPA1	6	5	RP2	8	8	SFPQ	5	6
PPIA	7	5	RPL10;RPL10L	5	5	SKT;KIAA1217	6	14
PPIB	9	8	RPL10A	6	6	SLC12A2	11	7
PPP1R12A	12	5	RPL13	7	7	SLC12A4	10	11
PPP2CB;PPP2CA	5	3	RPL13A	6	6	SLC12A9	5	5
PPP2R1A	15	14	RPL15	10	8	SLC16A1	11	10
PRDX1	8	8	RPL17	6	5	SLC16A3	9	8
PRDX2	6	6	RPL18	5	5	SLC1A3	4	5
PRDX3	5	4	RPL18A	5	5	SLC1A5	11	9
PRDX6	8	8	RPL23A	5	4	SLC25A3	6	5

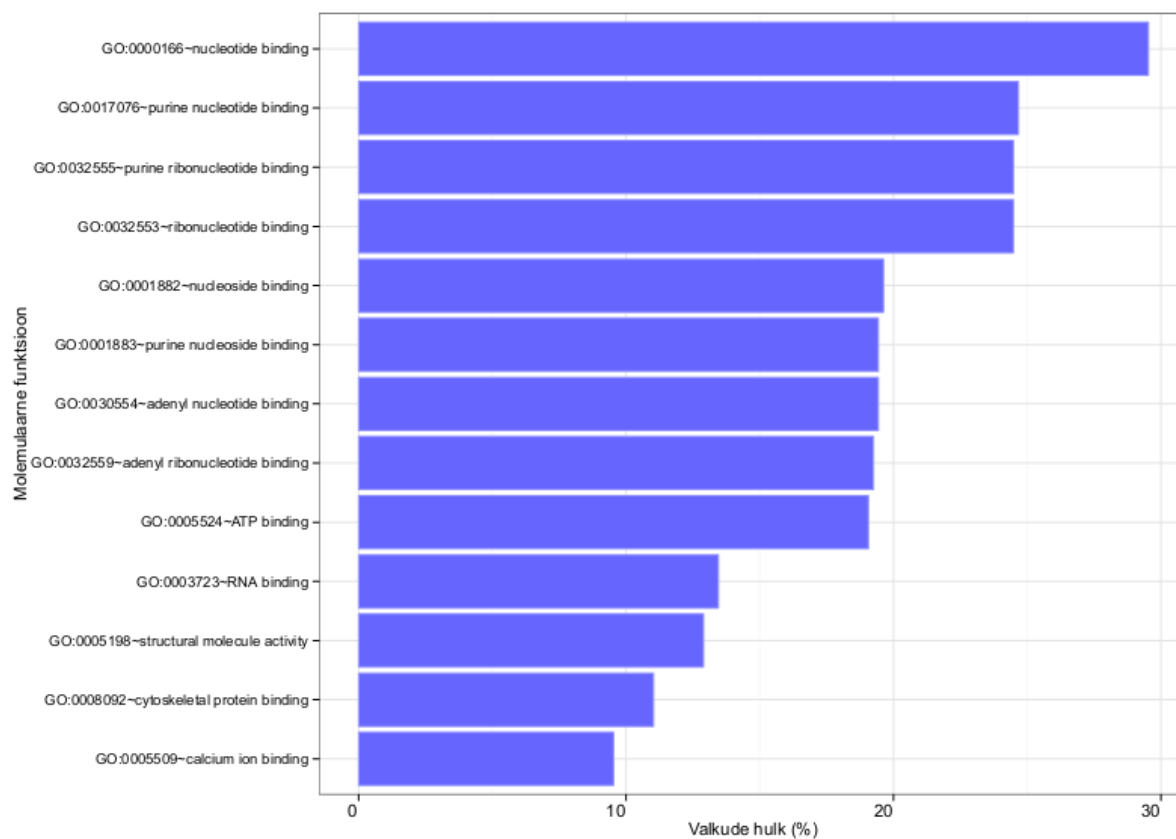
Geeni nimed	JAR MV	JEG MV	Geeni nimed	JAR MV	JEG MV
SLC25A5	5	5	TCP1	19	16
SLC29A1	9	7	TECR	7	7
SLC2A1	9	9	TFRC	28	26
SLC2A3;SLC2A14	11	11	TJP2	9	9
SLC34A2	6	2	TKT	13	12
SLC38A1	3	5	TLN1	40	34
SLC44A2	6	6	TMED10	5	5
SLC4A2	8	9	TMEM2	16	14
SLC4A7	12	12	TMEM30A	5	5
SLC5A6	7	6	TPI1	10	9
SLC7A5	4	5	TPT1	5	3
SLC9A1	10	9	TRIM28	6	7
SLC9A3R1	16	14	TTC7B	8	5
SMPDL3B	6	4	TUFM	5	3
SNAP23	12	12	TWF1	10	6
SND1	24	22	TXNDC5	7	7
SNRNP200	6	6	UBA1	12	12
SNX2	12	9	UGP2	11	10
SNX5	5	2	USP14	5	3
SPTAN1	60	69	VAMP7	5	4
SPTBN1	41	50	VAMP8	7	7
SPTLC1	5	3	VAR5	14	11
SSR4	5	5	VAT1	6	5
ST13;ST13P5;ST13P4	5	4	VCP	21	17
STIP1	24	15	VDAC1	12	13
STOM	7	5	VDAC3	6	3
STRAP	10	7	WDR1	14	10
STT3A	7	7	VPS29	4	2
STT3B	10	6	VPS35	14	10
STX3	7	8	XPO1	3	5
STX4	4	5	XRCC5	13	13
STXBP1	8	4	YBX1;CSDA;YBX2	6	5
STXBP2	5	5	YES1	8	7
STXBP3	6	5	YWHAE	12	10
SUGT1	5	4	YWHAG	5	5
ZMPSTE24	6	4	YWHAH	6	6
TAGLN2	8	8	YWHAQ	6	6
TARS	12	6			

Lisa 2. JAR ja JEG-3 mikrovesiikulitest pärit valkude asukoht rakus. Mikrovesiikulites tuvastatud valkude võimalikku paiknemist rakus analüüsiti rikastusanalüüsiga geeni ontoloogia (GO) kategooriates kasutades veebitööriista David. X-teljel on märgitud vastavas raku fraktsioonis paiknevate valkude hulk protsentides.



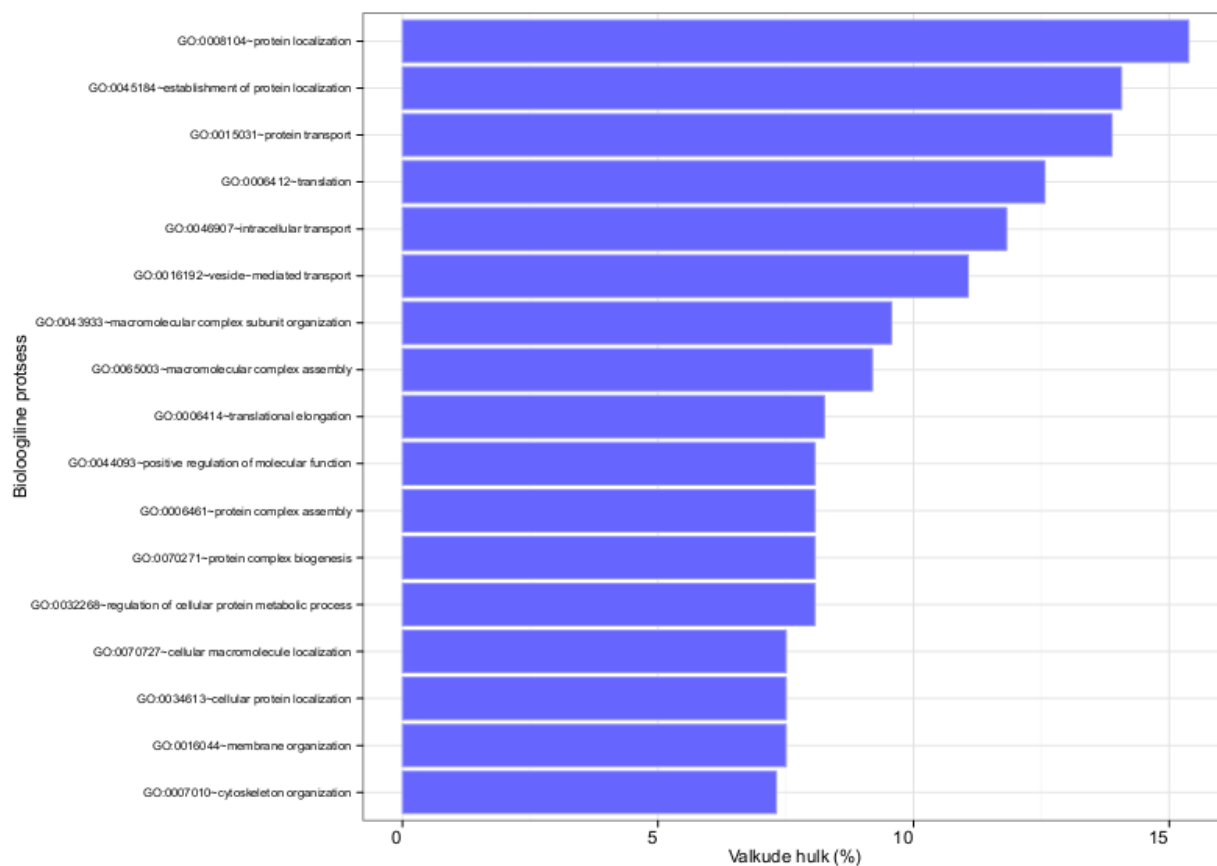
Lisa 3. JAR ja JEG-3 mikrovesiikulitest pärit valkude molekulaarne funktsioon.

Mikrovesiikulites tuvastatud valkude võimalikku molekulaarset funktsiooni analüüsiti rikastusanalüüsiga geeni ontoloogia (GO) kategooriates kasutades veebitööriista David. X- teljel on märgitud vastavat molekulaarset funktsiooni omavate valkude hulk protsentides.



Lisa 4. JAR ja JEG-3 mikrovesiikulitest pärit valkude roll bioloogilistes protsessides.

Mikrovesiikulites tuvastatud valkude võimalikku rolli bioloogilistes protsessides analüüsiti rikastusanalüüsiga geeni ontoloogia (GO) kategooriates kasutades veebitööriista David. X- teljel on märgitud vastavat bioloogilist rolli omavate valkude hulk protsentides.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mariann Koel

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 07.02.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 mikrovesiikulite proteoomiline analüüs ja nende sissevõtmine endomeetriumi rakuliini RL95-2,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Sulev Ingerpuu ja Andres Salumets,

(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 05.27.2013 (*kuupäev*)